

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Utilidad clínica del seguimiento cuantitativo del quimerismo
en leucocitos activados y linfocitos T reguladores post
trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Víctor Noriega Concepción

DIRECTORES

**Ismael Buño Borde
José Luis Díez Martín
Jesús Millán-Núñez Cortés**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Ciencias Médicas

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Utilidad clínica del seguimiento cuantitativo del quimerismo
en leucocitos activados y linfocitos T reguladores post
trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos**

Memoria para optar al grado de Doctor en Medicina

Presentada por

Víctor Noriega Concepción

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Ciencias Médicas

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Utilidad clínica del seguimiento cuantitativo del quimerismo
en leucocitos activados y linfocitos T reguladores post
trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos**

Memoria para optar al grado de Doctor en Medicina

Presentada por

Víctor Noriega Concepción

Directores

Ismael Buño Borde
Jose Luis díez Martín
Jesús Millán Núñez-Cortes

Madrid, 2015



El Dr. Ismael Buño Borde, Responsable del Laboratorio de Genética Hematológica (Servicio de Hematología y Hemoterapia HGU Gregorio Marañón, Madrid); el Dr. Jose Luis Díez Martín, Jefe de Servicio del Departamento de Hematología (Servicio de Hematología y Hemoterapia, HGU Gregorio Marañón, Madrid); y el Dr. Jesús Millán Núñez-Cortés, Catedrático de Medicina (Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid) y Jefe de Servicio de Medicina Interna (Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid)

Certifican:

Que el trabajo titulado **“Utilidad clínica del seguimiento cuantitativo del quimerismo en leucocitos activados y linfocitos T reguladores post trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos”** ha sido realizado por Don. Víctor Noriega Concepción en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor.

Agradecimientos

Quisiera mostrar mi agradecimiento a todas las personas que de una manera u otra han contribuido a la realización de este trabajo.

A Ismael, mi profesor y amigo. Gracias por compartir tu pasión por la vida y la ciencia conmigo. Por enseñarme los recovecos de la investigación. Por enseñarme a ser mejor persona, a ser mejor compañero. Gracias por todas esas tardes de café, bromas y por supuesto trabajo en el “labo”.

A Jose Luis Díez-Martín, mi “jefe”. Gracias por darme la oportunidad de ser algo más que un Hematólogo. Por enseñarme a ser exigente con uno mismo, a mirar más allá de donde todos miran.

A todos los compañeros del HGU Gregorio Marañón, ya sean médicos, enfermeras, administrativos (Dr Gayoso, Dr Anguita, Dra Kwon, Dr Serrano, Pascual Balsalobre, Cristina Muñoz. Y en especial a los técnicos del Laboratorio de Genética Hematológica sin los cuales este trabajo habría sido imposible.

A Carolina, fiel compañera de laboratorio, trabajadora incansable. Por los buenos momentos y risas que nos hemos pasado en ese laboratorio.

A mis compañeros del Hospital de Coruña, adjuntos, residentes, ... En especial al Dr. Battle por su confianza.

A mi familia, por todo el apoyo incondicional que siempre me han dado en todas las decisiones de mi vida. En especial a mis padres Lupe y Jenaro, por todo el cariño que siempre me han dado, por enseñarme que no hay nada imposible si lo intentas, y que con esfuerzo siempre obtienes una buena recompensa. A mi hermana, mi tía Ana, y todos los demás, que siempre se preocupan por el médico de la familia.

A Ana, mi amor.

Por enseñarme a ser valiente, a ser mejor amigo. Por ponerme los pies en la tierra todos los días, por enseñarme a disfrutar a lo grande de las pequeñas cosas.

Porque sin ti nada de esto tendría sentido.

“La ciencia es respecto del alma lo que es la luz respecto de los ojos, y si las raíces son amargas, los frutos son muy dulces”

(Aristóteles, 384 AC-322 AC.)

Abreviaturas empleadas

Alo-TPH: trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos

ATG: Gammaglobulina anti-timocito

Auto-TPH: trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

Bux: Busulfán

CFX: Ciclofosfamida

CsA: Ciclosporina

CMV: Citomegalovirus

EICH: Enfermedad injerto contra huésped

EICL: Enfermedad injerto contra leucemia

EICR: Enfermedad injerto contra receptor

EICR aguda: Enfermedad injerto contra receptor aguda

EICR crónica: Enfermedad injerto contra receptor crónica.

Flu: Fludarabina

HLA: Siglas en inglés de *human leucocyte antigen*

ICT: Irradiación corporal total

LA: Leucocitos activados, CD25+.

LAL: Leucemia aguda linfoblástica

LAM: Leucemia aguda mieloide

LT: Linfocitos T, CD3+.

MA: Mieloablativo

MF: Mielofibrosis

MO: Medula ósea

MRT: Mortalidad relacionada con el trasplante

MTX: Metotrexate

NMA: No mieloablativo

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PH: progenitores hematopoyéticos

RC: Remisión Completa

RP: Remisión parcial

SP: Sangre periférica

Tregs: Leucocitos T reguladores CD4+/CD25+

1. Indice

1. Índice	1
2. Resumen	5
2.1 Resumen	7
2.2 Introduction	8
2.3 Matherials and methods	9
2.4 Results.....	9
3. Introducción	13
3.1 Historia y situación actual del trasplante de progenitores hematopoyéticos..	15
3.2 Enfermedad injerto contra receptor	20
3.3 EICR y enfermedad injerto contra leucemia (EICL)	26
3.4 Quimerismo hematopoyético.....	27
3.5 Leucocitos activados	32
3.6 Linfocitos T reguladores	33
4. Hipótesis	37
5. Objetivos	41
6. Material y métodos.....	45
6.1 Definiciones.....	47
6.2 Pacientes	49
6.3 Material y métodos	52
6.4 Muestras	53
6.5 Separación inmunomagnética CD3+, CD25+ y CD4+/CD25+.	53
6.5.1 Separación inmunomagnética CD3+, CD25+.	54
6.6 Estudio de factibilidad para el análisis del quimerismo en CD4+/CD25+ Tregs post Alo-TPH.	56
6.7 Purificación de ADN.....	58
6.8 Realización de la PCR	60
6.9 Análisis de los resultados.	60
6.10 Análisis estadístico.....	62
7. Resultados.....	63
7.1 Dinámica del quimerismo post Alo-TPH	66
7.2 Dinámica del quimerismo en Tregs	67
7.3 Dinámica del quimerismo en Leucocitos activados, LA	69
7.4 Factores que influyen en la dinámica del quimerismo y la consecución de QC71	
7.5 Correlación entre la dinámica del quimerismo y el resultado del trasplante..	74
7.6 Supervivencia y quimerismo en Tregs.....	79
7.7 Supervivencia y quimerismo en LA.....	79
7.8 Análisis comparativo del quimerismo en LT y LA.....	80
7.9 Análisis comparativo del quimerismo en LT y Tregs.....	83
7.10 Análisis del quimerismo en Tregs y LA.	87
8. Discusión.	91
8.1 Dinámica del quimerismo en Linfocitos Tregs (CD4+/CD25+)	96
8.2 Dinámica del quimerismo en leucocitos activados	101
8.3 Pacientes con distinta dinámica de quimerismo en LT, Tregs y LA	104
10. Bibliografía	111
11. Anexo I	121

2. Resumen

2.1 Resumen

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH), descubierto en los años 50, constituye en la actualidad una herramienta terapéutica para el manejo de enfermedades hematológicas. Con altas tasas de morbi-mortalidad, la enfermedad injerto contra receptor (EICR) es su complicación más importante.

El análisis del quimerismo hematopoyético, es decir del porcentaje de celularidad del donante o del receptor tras la infusión del injerto, es utilizado clínicamente para el seguimiento post Alo-TPH, siendo utilizado para predecir diversas complicaciones, más aún cuando éste se lleva a cabo sobre linajes leucocitarios. En este contexto, y conocido el papel de los linfocitos T (CD3+, LT), los leucocitos activados (CD25+, LA) y linfocitos T reguladores (CD4+/CD25+, Tregs) en el Alo-TPH, el objetivo de este estudio es el análisis del quimerismo en dichos linajes y su implicación en el desarrollo de complicaciones.

El análisis del quimerismo hematopoyético se llevó a cabo mediante PCR de microsatélites sobre muestras de ADN de SP, y linajes leucocitarios (LT, LA y Tregs) purificados mediante técnicas inmunomagnéticas, con posterior electroforesis capilar.

La dinámica del quimerismo hematopoyético así como la consecución de QC en LA y Tregs mostró diferencias con respecto a la observada en SP y LT, con una consecución de QC más tardía y un mayor porcentaje de celularidad de receptor en los primeros 100 días tras el Alo-TPH.

La consecución de QC en LA predice mejor el desarrollo de EICR aguda que el QC en LT. Sin embargo, ni la dinámica de quimerismo ni el QC afectó a la SG, SLE ni a la MRT. En cuanto a los Tregs, la dinámica de quimerismo y el QC no afectaron al desarrollo de EICR. Aunque tampoco afectaron a la SG o la SLE, existe una tendencia a una menor MRT y mejores resultados cuando los pacientes adquieren QC de manera tardía.

2.2 Introduction

Allogeneic stem cell transplantation (Allo-SCT) is a procedure discovered around 1950, and is currently worldwide used as a regular therapeutic tool for the treatment of malignant and non-malignant hematological diseases. Its success resides in the substitution of the lymphohematopoietic system of a patient, from a healthy one from a different person.

Despite the better knowledge of the immunobiology of Allo-SCT, and a better management of its complications, it is still a procedure with high rates of morbidity and mortality, with long term survival rates around 40-50%, and a transplant related mortality around 20%.

Graft versus host disease (GVHD, acute or chronic) is the main cause of morbidity-mortality. Donor cells, once infused in the patient and after an activation process, recognize recipient's cellularity and attack it mainly in gut, skin and liver. However, this complication is associated with the known graft versus leukemia effect, in which donor cellularity eradicate residual tumor cells in the patient.

This allotolerance and alloreactivity balance between donor and recipient plays an important role in the transplant outcome, with different methods described to analyze it. Chimerism analysis is one of them, that studies the balance between donor and recipient hematopoietic cellularity after infusion, and in which complete chimerism (100% donor cells) is associated with better outcome but higher degree of GVHD, and mixed chimerism (<100% donor cells) is associated with lower complications but higher rates of disease relapse.

The role of CD25+ activated leukocytes (LA) and CD4+/CD25+ T regulatory cells (Tregs) has been studied in the Allo-SCT setting, and their association with the development of several complications after it. Though, the main objective of this study is to analyse the chimerism dynamic of LA y Tregs in the after Allo-SCT and its role in the development of the main complications after transplant.

2.3 Materials and methods

For the present study, samples and clinic data were obtained from patients submitted to Allo-SCT in Hospital Universitario Gregorio Marañón. 68 patients were included, transplanted from 2001 to 2010. Simultaneous chimerism analysis in LA and Tregs was conducted in 37 patients.

Chimerism analysis was performed by STR-PCR of microsatellites (STR; AmpFISTR SGM Plus; Applied Biosystems) on DNA of peripheral blood (PB) and leukocyte lineages (LT CD3+, LA CD25+ y Treg CD4+/CD25+) purified by immunomagnetic technique (Miltenyi Biotec), with capillary electrophoresis by automatic sequencing (ABI Prism 3100; Applied Biosystems).

Results were analysed by Genemapper V 4.0, identifying STR markers to differentiate donor and recipient hematopoiesis.

2.4 Results

Chimerism analysis revealed that complete chimerism (CC) achievement occurs later in LA and Tregs, when compared to PB or T cells. Quantitative analysis also revealed that a higher percentage of recipient cellularity was present in LA and Tregs within the first 100 days after Allo-SCT, when compared to PB and T cells.

The analysis of the main factors that affected chimerism dynamic and CC acquisition showed that patients with lymphoid malignancies, patients with 2 or more prior chemotherapy lines, and patients that did not receive fludarabine as part of the conditioning had a higher probability of CC in LA in day +30 and +60, while patients with lymphoid malignancies, and patients that did not receive fludarabine as part of the conditioning had a higher probability of CC in Tregs in day +30.

The chimerism dynamic in Tregs showed that CC acquisition was not associated to any grade of acute GVHD (grade II-IV or III-IV) or chronic GVHD (any grade). The analysis in LA showed that CC achievement in day +30 was associated

with the development of acute GVHD grade II-IV, and that CC in day +90 was associated with chronic GVHD moderate to severe.

Overall survival (OS), event free survival (EFS) and transplant related mortality (TRM) was not affected by chimerism dynamic in Tregs. However, MC persistence in day +60 and +90 showed a trend to a lower TRM, as none of the 7 patients in this situation died or relapse.

Chimerism dynamic in LA did not affect overall survival (OS), event free survival (EFS) and transplant related mortality (TRM) either.

Combined analysis of LA and T cells showed that chimerism dynamic and CC achievement was different in 17/68 patients. In this context, all the patients that achieved CC in LA before than in T cells developed acute GVHD grade II-IV (5/5). Moreover, GVHD occurred just immediately after CC in LA was achieved. On the other hand, only one patient that achieved CC later in LA than in T cells (1/11) developed this complication.

Combined analysis of Tregs and T cells chimerism dynamic and CC achievement showed differences in 11/37 patients, with a trend to a better outcome in patients with later CC in Tregs, probably due to a lower TRM.

2.5 Discussion and conclusions

CD25+ Activated Leukocytes (LA) and CD4+/CD25+ T regulatory cells (Tregs) have a different chimerism dynamic after Allo-SCT, when compared to T cells and peripheral blood in 25-30% of patients.

Chimerism dynamic in Tregs showed that CC achievement occurs later when compared to T cells, PB and LA, that the percentage of recipient cellularity is higher in Tregs than in T cells, PB and LA, and that patients with lymphoid malignancies and those who did not receive fludarabine in the conditioning had a higher probability of CC

achievement in day +30. Chimerism dynamic did not affect OS or EFS. However, MC in Tregs was associated to a trend to a lower TRM after Allo-SCT.

Chimerism dynamic in LA showed that CC achievement is later when compared to T cells and PB, that the percentage of recipient cellularity is higher in Tregs than in PB, and that patients with lymphoid malignancies, those who received more than 2 lines of chemotherapy and those who did not receive fludarabine in the conditioning had a higher probability of CC achievement in day +30 and +60. Chimerism dynamic did not affect OS, EFS or TRM.

Complete chimerism in LA anticipates GVHD grade II-IV development better than chimerism in T cells do, while CC in Tregs did not.

3. Introducción

3.1 Historia y situación actual del trasplante de progenitores hematopoyéticos

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (Alo-TPH) representa en la actualidad la única opción terapéutica para muchos pacientes con enfermedades hematológicas (neoplásicas o no neoplásicas) (1). Se trata de un procedimiento, cuyo éxito o fracaso reside en un adecuado recambio del tejido hematopoyético del paciente por el de un individuo sano, después de altas dosis de quimioterapia/radioterapia y de un proceso de acondicionamiento previo a la infusión de los progenitores. Para llevar a cabo un Alo-TPH, es preciso disponer de un donante compatible, ya sea familiar o voluntario, estimándose que las posibilidades de tener un donante genéticamente compatible para un Alo-TPH rondan el 30% (2), si se trata de un hermano, y aumentan hasta el 50-60% si se añade la posibilidad de encontrar un donante no familiar en los registros internacionales de donantes voluntarios (3). Si añadimos a la búsqueda los bancos de sangre de cordón umbilical y los donantes haploidénticos, las posibilidades de que un paciente disponga de un donante compatible para un Alo-TPH se aproximan al 100% (3,4).

La historia del trasplante de progenitores hematopoyéticos comienza a mediados del siglo 20, cuando diversos estudios en animales demuestran la posibilidad de sustituir el tejido hematopoyético de un animal por otro genéticamente idéntico (TPH singénico), tras la infusión de progenitores hematopoyéticos del donante en el receptor, sin provocar la muerte de éste (5). La aplicación de este procedimiento utilizando donantes alogénicos (con cierto grado de disparidad genética) abre la puerta al tratamiento de enfermedades del sistema hematopoyético, incurables hasta la fecha, pero evidenciándose unas altas tasas de mortalidad en sus inicios, debidas principalmente a dos complicaciones.

1) Una de ellas asociada al fallo del prendimiento hematopoyético tras la infusión de los progenitores, o a un rechazo del mismo de una manera precoz.

2) El otro, debido a una reacción inflamatoria en el receptor tras la infusión de los progenitores, y que mediada por el injerto infundido, afecta principalmente a piel, hígado y tejido gastrointestinal comprometiendo la vida de los animales trasplantados. A este fenómeno se le denominó enfermedad injerto contra huésped (EICH), o enfermedad injerto contra receptor (EICR). Se observa en estos comienzos, como una característica de suma importancia, que esta EICR es más agresiva cuanto mayor es la disparidad genética entre donante y receptor.

Basándose en estos modelos animales, el primer trasplante de progenitores hematopoyéticos en humanos es publicado por el *Dr. E. Donall Thomas* de la Universidad de Columbia (6), el cual fue galardonado con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1980, galardón compartido con el *Dr. Joseph Edward Murray*, por su contribución al desarrollo de este procedimiento médico.

En los años posteriores a la publicación de este primer trabajo, y apoyados en un mayor conocimiento de la fisiopatología del trasplante alogénico, se comienzan a desarrollar nuevas estrategias para mejorar los resultados del Alo-TPH. Se empiezan a utilizar nuevos fármacos, y a analizar el posible uso de fármacos ya existentes para mejorar y en algunas ocasiones evitar las complicaciones derivadas del trasplante. Así, por ejemplo, se comienzan a utilizar quimioterápicos como la ciclofosfamida y otros procedimientos como la radioterapia, en el acondicionamiento pre-trasplante, para intentar crear en el receptor un nicho adecuado para el injerto hematopoyético (7). Por otro lado, se identifican a los linfocitos derivados del donante como las células implicadas en el desarrollo de la EICR, y se comienzan a utilizar drogas inmunosupresoras como el metotrexato para intentar evitar su aparición y también para su tratamiento una vez instaurado (8). Pese a estos avances, y pese a las

mejoras en los resultados, obtenidos con estas medidas, en comparación a los modelos experimentales, las altas tasas de recaída continuaban siendo uno de los principales problemas en los años 60-70, con periodos máximos de remisión de 3-6 meses tras el trasplante (9).

De manera paralela a estos avances en el manejo clínico de los pacientes trasplantados, en el campo de la inmunología tiene lugar un descubrimiento que a la postre resultaría crucial para el desarrollo del trasplante alogénico, no sólo de progenitores hematopoyéticos, sino de órganos sólidos. En 1958 el *Dr. Jean Dausset* describe por primera vez el sistema HLA (siglas en Inglés de *Human Leucocyte Antigen*), observando que algunos sueros de pacientes tratados con transfusiones de origen diverso, contenían anticuerpos contra los glóbulos blancos de la sangre (10). La naturaleza de este sistema de antígenos queda finalmente establecida en 1967 (11–13), y sienta las bases de la compatibilidad entre donante y receptor que a la postre establecerían los criterios a seguir para la selección de donantes en el ámbito del trasplante. Años más tarde, en 1977, el grupo de Seattle liderado por el *Dr. E. Donall Thomas* (14), publica una de las primeras grandes series de pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, en la que los donantes son seleccionados de acuerdo a la compatibilidad sistema HLA, y utilizando un acondicionamiento pre-trasplante basado en ciclofosfamida y radioterapia.

Desde las primeras publicaciones relacionadas con el Alo-TPH, éste procedimiento ha ido evolucionando y es en la actualidad una herramienta más dentro del arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de enfermedades hematológicas neoplásicas y no neoplásicas (1), así como (cada vez en mayor número) de enfermedades no hematológicas. En Europa, a principios del año 2015, se encuentran registrados un total de 435.219 pacientes y 515.355 trasplantes, de los que 36.940 se corresponden al año 2014 (más de 60.000 en todo el mundo en el mismo año, datos del European Bone Marrow Transplantation Group, Annual Report 2014,

www.ebmt.org) en un total de 48 países y 651 centros. Las estadísticas además, señalan que el número de pacientes trasplantados aumenta de manera progresiva, observándose un crecimiento del 50% en los últimos 10 años. De todos los trasplantes realizados, aproximadamente el 40% fueron Alo-TPH, y las principales indicaciones fueron leucemias, linfomas y enfermedades no malignas (Figura 1.)

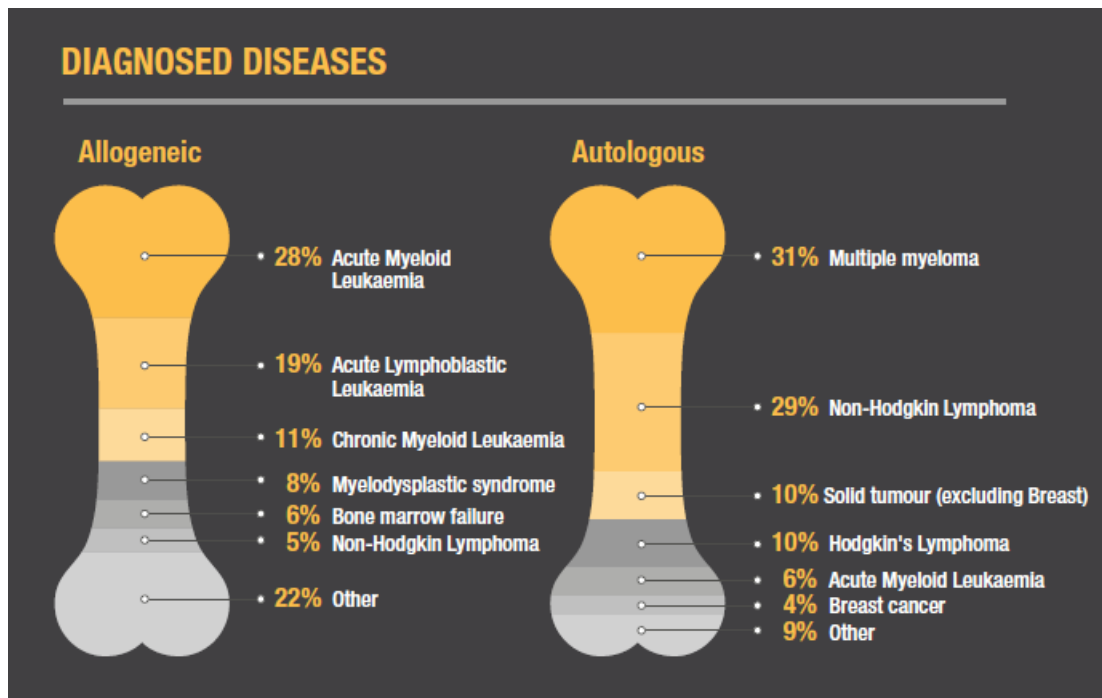


Figura 1. Esquema representativo de las diferentes enfermedades sometidas a trasplante de progenitores hematopoyéticos, alogénico y autólogo (datos del EBMT 2014, www.ebmt.org).

Además de este avance en el número de trasplantes realizados, se han llevado a cabo grandes avances científicos relacionados con la inmunobiología del trasplante, los cuales aplicados a la práctica clínica han provocado una mejora tanto de los datos de supervivencia como de la calidad de vida de los pacientes trasplantados. Estos avances se basan principalmente en:

1) el uso de nuevos fármacos para evitar y tratar la EICR, como la ciclosporina, tacrolimus, anticuerpos monoclonales, etc;

2) un mejor manejo de las complicaciones post Alo-TPH, como infecciones (víricas, fúngicas y bacterianas) con más eficaces antimicrobianos y con el inicio de terapias preventivas;

3) el desarrollo de métodos de alta resolución para el tipaje HLA que ha mejorado la selección de donantes, y mediante los cuales se ha llevado a que los resultados de trasplantes de donante familiar y de donante no emparentado sean en la actualidad superponibles;

4) el mejor manejo de las diferentes fuentes de PH (médula ósea, SP o cordón umbilical);

5) la introducción de regímenes de acondicionamiento con intensidad reducida, que han reducido las tasas de mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) y ampliado el abanico de pacientes candidatos a trasplante que, ya sea por edad o por co-morbilidades, no son candidatos a Alo-TPH mieloablativos;

6) el desarrollo de registros de donantes voluntarios internacionales, mediante los cuales se han incrementado las posibilidades en encontrar un donante compatible.

Sin embargo, y pese a estas mejoras, las tasas de supervivencia largo plazo tras un Alo-TPH se encuentran entre el 40-50% en caso de LAM o SMD, con tasas de recaída próximas al 30%, persistiendo además tasas de mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) del 20-30%, algo menores con el desarrollo de Alo-TPH con acondicionamientos de intensidad reducida (o no mieloablativos). En este contexto, y pese a todos estos avances, la EICR descrita anteriormente es la principal causa de morbi-mortalidad en el post Alo-TPH (Figura 2)(15).

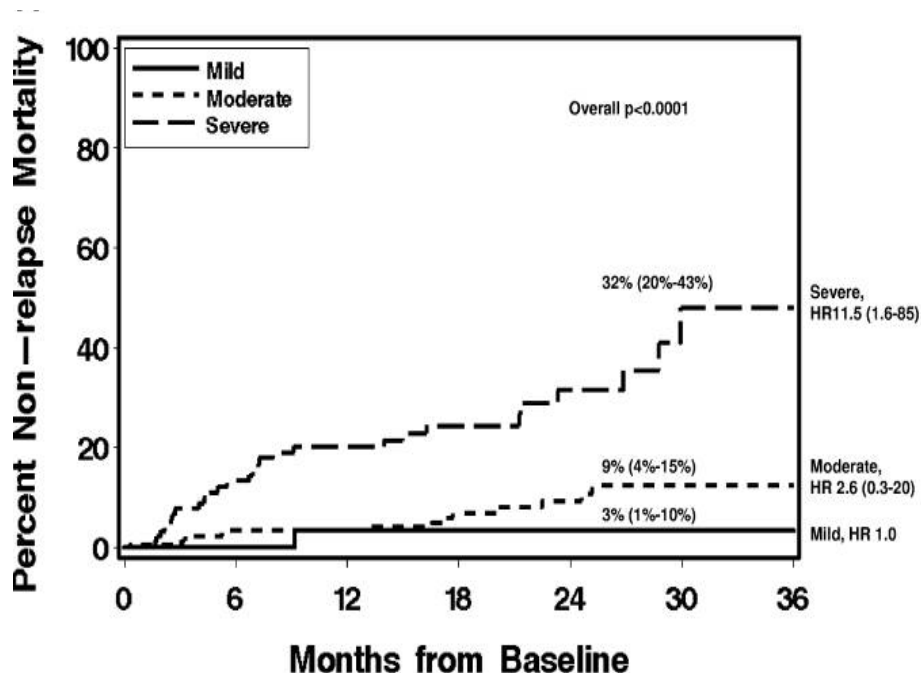


Figura 2. Mortalidad no relacionada con la recaída en función de la severidad de la EICR crónica (15).

3.2 Enfermedad injerto contra receptor

La EICR es una reacción inflamatoria en el receptor tras la infusión de progenitores, y que mediada por el injerto infundido, afecta a diferentes órganos y tejidos post Alo-TPH, contribuyendo a aumentar la morbi-mortalidad del procedimiento. Históricamente se definen dos tipos de EICR, basándose en la experiencia del grupo de Seattle, encabezado por el *Dr. E. Donall Thomas*. La forma aguda tiene lugar en los primeros 100 días del trasplante, la cual es un proceso inflamatorio que afecta principalmente al tejido hepático, gastrointestinal y cutáneo, y puede llegar a afectar hasta a un 40% de los pacientes sometidos a un trasplante de hermano HLA-idéntico, y hasta un 60% si se trata de un donante no relacionado. La otra forma, denominada EICR crónica, es un desorden de la inmunomodulación mediado por leucocitos del donante, que ocurre generalmente más allá del día +100 post Alo-TPH, y que

comparte características de inmunodeficiencia. Ambas entidades presentan características clínico-biológicas diferenciadas, sin embargo en ocasiones se superponen apareciendo formas de EICR crónicas antes del día 100, así como formas agudas tras el día 100, o incluso formas crónicas agudizadas, haciendo en ocasiones difícil el diagnóstico diferencial entre ambas.

La EICR, en cualquiera de sus formas, es un ejemplo de efecto aloinmune, y como tal, la disparidad HLA entre donante y receptor es el principal factor de riesgo para su desarrollo (16), con lo que a mayor grado de disparidad, mayor probabilidad de desarrollarla en sus formas más severas. Otros factores de riesgo importantes para el desarrollo de EICR son la edad del paciente, el uso de mujeres como donantes, el uso de donantes no emparentados, una aloinmunización previa del donante, la seropositividad para CMV del paciente, la esplenectomía previa al trasplante, etc. Por otro lado, el acondicionamiento pre-trasplante y las diferentes terapias inmunosupresoras pueden aumentar o disminuir el riesgo de desarrollar EICR. Así, la radioterapia en el acondicionamiento se asocia a mayores tasas de EICR, y al contrario la introducción de alemtuzumab y otras drogas inmunosupresoras como profilaxis de EICR reduce la incidencia de la misma (17,18). También, el desarrollo previo de EICR en su forma aguda predispone a desarrollar formas severas de EICR crónica (17).

3.2.1 EICR aguda

La EICR aguda es un fenómeno en el que células T del donante responden a determinadas proteínas genéticamente distintas en el receptor (19), activándose y generando una acción tóxica contra el mismo. De éstas, las más importantes son las proteínas del sistema HLA (20), las cuales son altamente polimórficas. Las proteínas HLA clase I (A, B y C) se encuentran en casi todas las células nucleadas del organismo, mientras que las de clase II (DR, DQ y DP) se expresan principalmente en

las células hematopoyéticas (monocitos, células dendríticas y células B), pero su expresión puede ser inducida en muchas otras células tras un fenómeno de inflamación o daño tisular. La incidencia y severidad de la EICR aguda está relacionada con el grado de disparidad del sistema HLA entre donante y receptor (17). Sin embargo, existen otros antígenos menores fuera del sistema HLA, que hacen que también se desarrolle la EICR incluso entre individuos HLA idénticos (21).

La fisiopatología de la EICR aguda, se puede definir en 5 pasos (Figura 3) (20,22)

1) tras el daño tisular provocado por el acondicionamiento quimio y/o radioterápico se produce en el paciente una cascada inflamatoria que lleva a la secreción de citocinas proinflamatorias, las cuales en última instancia provocan la activación y maduración de células presentadoras de antígenos (CPA) del paciente y del donante (23,24);

2) estas CPA llevan a cabo una activación de linfocitos T y células NK del donante a través del reconocimiento por estas células de disparidades en el sistema HLA u otros antígenos menores, aumentando además la expresión de moléculas co-estimuladoras (24–26).

3) proliferación de estos Linfocitos T y células NK del donante y diferenciación a células vírgenes, efectoras, de memoria, reguladoras, Th17 y otros subtipos (27);

4) migración de estos Linfocitos T a diferentes órganos diana (piel, hígado y tejido gastrointestinal) (27).

5) destrucción directa de los tejido ya sea por acción citotóxica directa o a través de una reacción quimiotóxica (19,22).

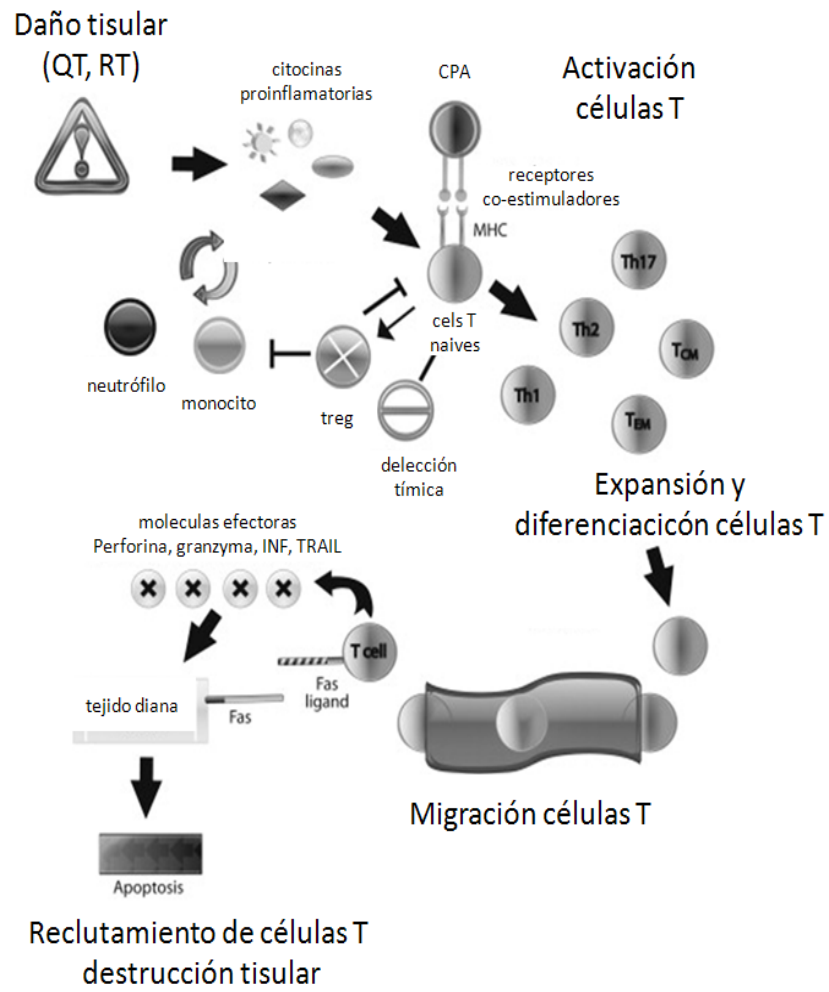


Figura 3. Fisiopatología de la enfermedad injerto contra receptor (Sung AD et al, 2013) (22).

3.2.2 EICR crónica

A diferencia del amplio conocimiento de la fisiopatología de la EICR aguda, la forma crónica es menos conocida. Se trata de un desorden de la inmunomodulación que ocurre generalmente más allá del día +100 post Alo-TPH, y que comparte características de inmunodeficiencia. Afecta al 40% de los Alo-TPH de donante HLA- idéntico, pero en determinadas situaciones puede llegar al 70% como es el caso de Alo-TPH de donante no emparentado. Es la principal causa de MRT más allá del día +100, tanto por los efectos secundarios derivados de su tratamiento como de las infecciones derivadas del estado de inmunosupresión que conlleva.

En la EICR crónica, los linfocitos T son también los responsables del proceso, en el que comienza a conocerse el papel de otros subtipos celulares como los linfocitos B en su desarrollo (28). En el desarrollo de la EICR crónica, las células epiteliales tímicas son dañadas por células T alorreactivas, provocando una disminución en la producción de células T reguladoras (Tregs), y favoreciendo la aparición de células T autorreactivas (Figura 4). Este balance entre Tregs y linfocitos T convencionales, resulta primordial para el desarrollo de EICR, observándose cómo pacientes con linfopenia CD4+ prolongada, y por tanto depleción de Tregs, tienen una mayor incidencia de EICR crónica (Figura 5).

En cuanto al papel de los LB, el daño provocado en el microambiente, puede ser la causa la homeostasis alterada de éstos, observada en pacientes con EICR crónica, en los que la interacción con los LT mediada por CPAs parece encontrarse alterada (Figura 4). En pacientes con EICR crónica, se ha observado además un retraso en la reconstitución de LB, un incremento de los factores de activación de cel-B (BAFF), y un aumento de células pre-centro germinal (29).

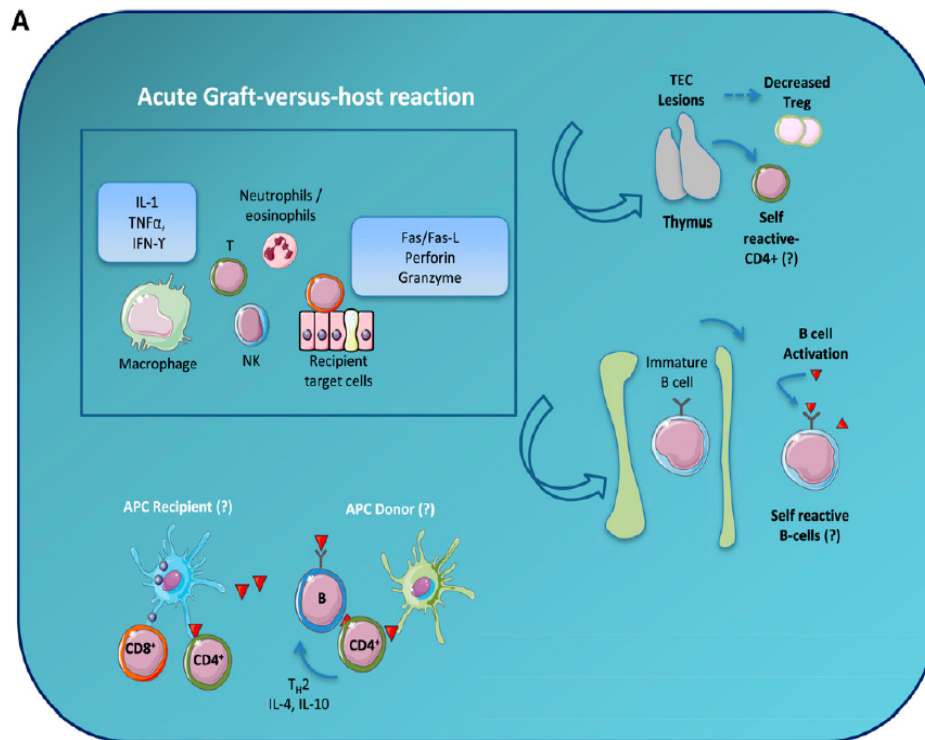


Figura 4. Representación del daño tímico y posterior descenso de Tregs, con aparición de células autorreactivas de estirpe T y B (29)

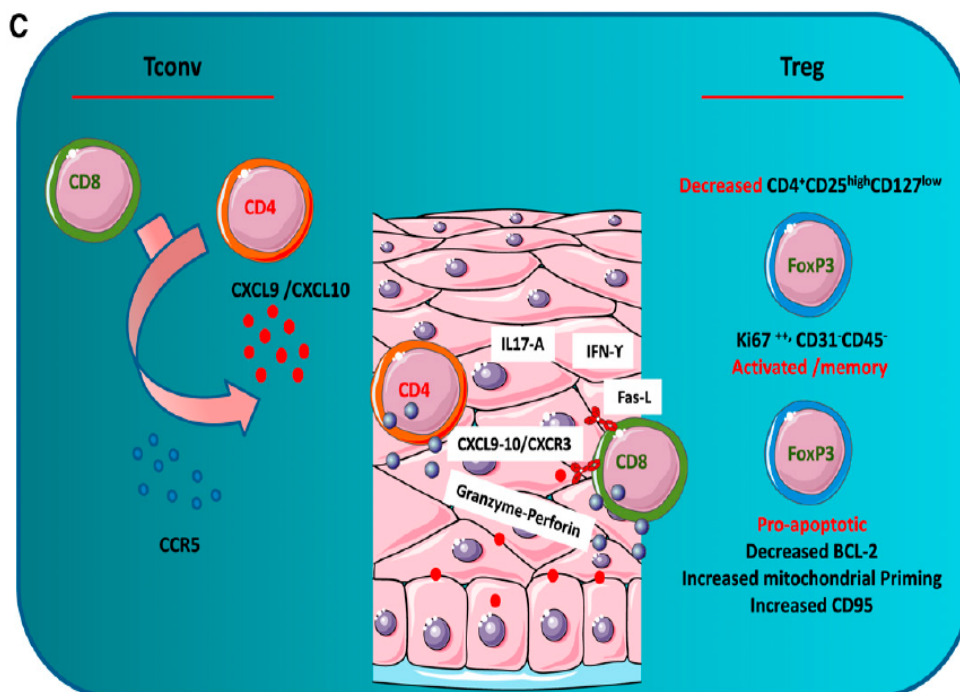


Figura 5. Representación del desbalance entre Tregs y LT convencionales (Tconv) en el desarrollo de EICR crónica (29).

3.3 EICR y enfermedad injerto contra leucemia (EICL)

Como se describió anteriormente, la EICR es la principal causa de morbi-mortalidad tras el Alo-TPH. Sin embargo, y conocidos todos sus efectos adversos a corto y largo plazo, múltiples estudios han demostrado que este fenómeno inmune donante contra receptor, va ligado de manera intrínseca a otro conocido como efecto injerto contra leucemia (EICL), haciendo que los mismos mecanismos que provocan un daño tisular reconozcan y ataquen a las células tumorales, disminuyendo así las tasas de recaída post Alo-TPH (30–35). Un claro ejemplo de este efecto es el uso de ILD (infusión de linfocitos del donante post Alo-TPH), que ha contribuido a controlar las tasas de recaída post Alo-TPH gracias al efecto EICL promovido por la alorreactividad de los linfocitos infundidos (36–38).

Por otro lado, y en contraposición al efecto alorreactivo entre donante y receptor, el éxito de un Alo-TPH también requiere el desarrollo de cierto grado de tolerancia inmune donante-receptor frente a antígenos alogénicos. La consecución de esta tolerancia inmune previene reacciones del receptor frente al injerto, por lo que se evita el rechazo del mismo, y por otro lado previene las reacciones del injerto contra el receptor, minimizando el desarrollo de la EICR. Los linfocitos T son los principales protagonistas de este fenómeno, y su regulación, tanto en individuos sanos como en el Alo-TPH se lleva a cabo a través de 2 mecanismos diferenciados: 1) depleción de células T autorreactivas durante la maduración tímica, definido como la eliminación de células T con receptores TCR para autoantígenos, y 2) supresión/eliminación de células T autorreactivas maduras de la circulación periférica, mediante células supresoras inmunológicamente activas (células T Reguladoras) o a través de inhibidores moleculares de células T autorreactivas (39).

3.4 Quimerismo hematopoyético

El balance entre alotolerancia y alorreactividad entre donante y receptor tras el Alo-TPH, determina, como hemos visto anteriormente, el éxito o fracaso del Alo-TPH. Ha sido fuente de multitud de investigaciones en las últimas 2 décadas, en las que se ha tratado de identificar 1) aquellos mecanismos que favorecen el desarrollo de la EICR con sus efectos negativos, para así evitarlos en la medida de lo posible y si llegado el caso tratarlos de la manera más adecuada y en el momento más oportuno, y 2) identificar también los mecanismos que favorecen el desarrollo de la enfermedad injerto contra leucemia (EICL) tratando de desligar ésta del desarrollo de la EICR, con intención de potenciarla.

En determinadas enfermedades como las leucemias agudas, por el alto riesgo de recaída, fomentar la alorreactividad (y por tanto la EICL) aumenta las posibilidades de éxito del trasplante. Sin embargo, en otras enfermedades como las Aplasias Medulares, se pretende favorecer la alotolerancia, y evitar esta alorreactividad en lo posible. El inclinar esta balanza hacia uno u otro lado, se consigue principalmente mediante el manejo de la inmunosupresión tras el Alo-TPH, o mediante la selección de determinados fármacos en el acondicionamiento. Así, en el seguimiento de los pacientes trasplantados, resulta crucial la medición/cuantificación de este balance entre alotolerancia/alorreactividad para la toma de decisiones. Resulta primordial disponer de datos analíticos y biológicos que nos informen, en la medida de lo posible de la situación real en el paciente trasplantado en un momento determinado, es decir, de su situación en la balanza de alotolerancia/alorreactividad.

Uno de los métodos utilizados para el seguimiento de este balance entre alotolerancia y alorreactividad, es el análisis de la relación entre las células del receptor y el tejido hematopoyético emergente del donante, en el llamado análisis del quimerismo hematopoyético. El término quimerismo hace referencia a un ser de la mitología Griega “Chimera” que poseía la cabeza de un león, el cuerpo de una cabra y

la cola de una serpiente. Fue utilizado por primera vez por *Anderson et al* en 1951 (40), quien escribió “a chimera is an organism whose cells derive from two or more distinct zygote lines”, y fue *Ford et al* 1956 (41) quien primero lo acuñó en el ámbito del trasplante de médula ósea.

En el Alo-TPH, tras la infusión del injerto procedente del donante, tiene lugar una co-existencia durante cierto tiempo de hematopoyesis del donante y del receptor de manera simultánea en el paciente, en lo que se denomina quimerismo mixto (QM), hasta que el nuevo sistema hematopoyético deriva en su totalidad del donante, en el llamado quimerismo completo (QC) (42). La consecución de este QC, se creía originalmente esencial para obtener un injerto adecuado en el post Alo-TPH (43), sin embargo se ha demostrado que el quimerismo entre donante y receptor en el post-trasplante es un proceso dinámico con grandes implicaciones en el éxito o fracaso del mismo (44–46). Así, el seguimiento y la cuantificación de este quimerismo, constituye en la actualidad una de las principales armas para el manejo del paciente trasplantado, más aún cuando este análisis se realiza en diferentes linajes celulares, ya que permite anticipar varias complicaciones que afectan al devenir del trasplante (43–46).

TPH Alogénico

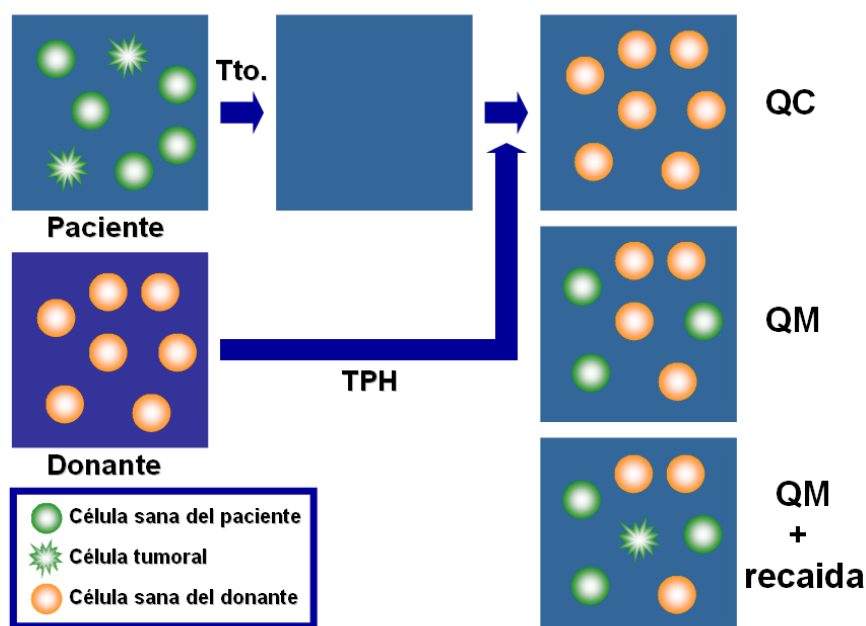


Figura 6. Representación esquemática de la sustitución del tejido hematopoyético del paciente por el del donante en el Alo-TPH. QC, quimerismo completo; QM, quimerismo mixto; Tto, tratamiento.

Los diferentes métodos utilizados para el análisis del quimerismo en el periodo post Alo-TPH han ido de la mano de los avances científico-tecnológicos que se han ido produciendo, y de su aplicación a las ciencias médicas. Así, estos estudios se han basado históricamente en análisis citogenético (47), fenotipado eritrocitario (48,49), hibridación in situ fluorescente (FISH, *fluorescent in situ hybridation*) de cromosomas sexuales (50) y polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) (51). Estas técnicas sin embargo no son aplicables a todos los pacientes, son muy laboriosas y presentan sensibilidades variables entre laboratorios. El punto de inflexión en el análisis del quimerismo tiene lugar tras el descubrimiento de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y de su aplicación en el manejo post Alo-TPH. La aplicación de la PCR sobre polimorfismos de microsatélites de ADN STR (*short tandem repeat*) junto con el marcaje fluorescente y lectura/revelado por electroforesis capilar (52,53) en un secuenciador automático de ADN se puede

considerar en la actualidad el procedimiento estándar para el seguimiento cuantitativo del quimerismo, convirtiéndolo en un procedimiento accesible, rápido, aplicable a todos los pacientes y con sensibilidades reproducibles próximas al 1% (51–55)

El análisis del quimerismo se realiza principalmente sobre ADN de sangre total (no fraccionada) y MO, y son los resultados de estos dos tipos de muestras los que sustentan la base del análisis del quimerismo hematopoyético. A grandes rasgos, se puede decir que la consecución de QC post Alo-TPH favorece el injerto hematopoyético, y la pérdida del mismo aumenta el riesgo de rechazo y/o recaída. Sin embargo, con el mejor conocimiento de la biología del cáncer, así como de la biología del trasplante alogénico y sus complicaciones, son también conocidas las implicaciones de la dinámica del quimerismo post trasplante, en el éxito o fracaso del mismo, no sólo en sangre total, sino en los diferentes subgrupos celulares que tienen un papel en el mismo.

Así, además del quimerismo sobre ADN de sangre total, el análisis del quimerismo en los linfocitos T CD3+ (LT), aporta información fundamental para predecir la obtención de un injerto hematopoyético adecuado y para el desarrollo de la EICL (56–58). Es conocido que existe una asociación entre la celularidad total del injerto y la cantidad de linfocitos T CD3+ del donante infundida en el paciente, con el desarrollo de diferentes complicaciones y eventos en el post Alo-TPH, como EICR aguda y crónica, recaída de la enfermedad e incluso rechazo del injerto. A mayor celularidad y mayor cantidad de LT CD3+, menor es la tasa de rechazo pues se facilita el injerto hematopoyético, pero mayor el riesgo de desarrollo de EICR, al infundir un mayor porcentaje de linfocitos con capacidad citotóxica. Sin embargo, esta mayor cantidad de LT favorece también la posibilidad de una mayor EICL, y por lo tanto una menor probabilidad de recaída. Conocido así el papel de los linfocitos CD3+ en el post Alo-TPH, el quimerismo en CD3+ ha demostrado ser más informativo que el análisis de la sangre periférica total (SP) para predecir el rechazo del injerto (41), así como el

estudio de eventos relacionados con la aloreactividad establecida entre donante y receptor después del Alo-TPH . Un QC temprano en LT CD3+ está asociado a mayores tasas de enfermedad injerto contra huésped (EICR), y a su vez con una menor tasa de recaída (EICL) (59–62).

Además del quimerismo en LT, el análisis del quimerismo sobre otros grupos celulares ha demostrado ser informativo en el seguimiento del paciente trasplantado. El quimerismo en células mieloides CD15+ ó CD33+ se utiliza como medida de enfermedad mínima residual post Alo-TPH en LAM (63), al igual que el quimerismo células CD34+ post Alo-TPH, el cual favorece la predicción de la recaída de una leucemia aguda y síndromes mielodisplásicos (64,65).

Sin embargo, y pese a que el análisis del quimerismo en LT continúa siendo la piedra angular del quimerismo en linajes, la selección de células CD3+ sobre la que se analiza el quimerismo, puede incluir tanto a linfocitos alorreactivos, como a no alorreactivos/naive, lo que puede disminuir la utilidad clínica del quimerismo en LT CD3+. En este contexto, y conocido el papel de otros subtipos de leucocitos en el desarrollo de diferentes eventos post Alo-TPH, el análisis del quimerismo en los mismos podría incrementar la utilidad clínica del quimerismo hematopoyético (62) para predecir el desarrollo de diferentes eventos.

3.5 Leucocitos activados

Uno de los subtipos leucocitarios más analizados en el Alo-TPH son los leucocitos CD25+ o leucocitos activados (LA). El receptor alpha de la interleucina-2 (CD25) es uno de los marcadores de activación celular conocidos más característicos (66). Se expresa principalmente en células CD3+ (CD4+ y CD8+), pero también en células B, monocitos y macrófagos en diferentes contextos (67). También se expresa en menor medida en células inmunes en “descanso”, en las que su expresión se regula mediante señales del receptor T (*T-cell receptor*) y por la IL-2 (68). La expresión de CD25 ha sido analizada en diferentes enfermedades inmunes (69,70), así como en el Alo-TPH, en el que se ha observado una sobreexpresión de CD25+ en los linfocitos T alorreactivos, con diferentes estudios demostrando una mayor expresión de CD25 en pacientes que sufren EICR aguda (71). Más aún, el análisis de la proporción/cantidad de LA contenidos e infundidos en el injerto, han demostrado una asociación con el desarrollo de diferentes complicaciones en el post Alo-TPH, existiendo estudios que demuestran que pacientes con EICR agudo habían recibido una mayor proporción de LT CD25+ en el injerto (67). Más aún, la depleción CD25+ tras el Alo-TPH como profilaxis del EICR con anticuerpos monoclonales anti-CD25 (Ac anti-CD25), está asociada a una menor incidencia y severidad de EICR (72). También, el uso de Ac anti-CD25 ha demostrado utilidad para el tratamiento EICR agudo severo (73), con la peculiaridad de que el uso de dicho fármaco parece no mitigar la actividad antitumor (EICL) post Alo-TPH, es decir su uso no ha demostrado un aumento de las tasas de recaída con la eliminación de células alorreactivas (74,75).

3.6 Linfocitos T reguladores

Otro de los subtipos leucocitarios ampliamente estudiados en el Alo-TPH son los leucocitos T reguladores (Tregs), un subtipo leucocitario que representa el 5-10% de toda la población de linfocitos CD4+. Su principal función es suprimir la proliferación y función efectora de células T, células B, células NK y células presentadoras de antígenos de forma antígeno dependiente y por presentación de antígenos por las células dendríticas (76). Los Tregs se caracterizan por expresar el receptor alpha de la interleucina-2 (*IL-2 receptor alpha*, CD25) y el factor transcripcional intracelular FoxP3 (CD4+CD25+FoxP3). La expresión de FoxP3 está asociada a la actividad supresora de los Tregs (77), la cual es adquirida principalmente en el timo, donde sufren una selección positiva por las células epiteliales de la cortical medular (78,79) antes de salir al torrente circulatorio. El déficit de FoxP3 y su déficit congénito provoca desastrosas enfermedades inmunológicas en animales y humanos (80)

Pese a la gran cantidad de estudios relacionados con los Tregs, no se conoce totalmente el mecanismo de acción por el que los éstos controlan los diferentes mecanismos inmunes tanto en individuos sanos, como en el seno de procesos inmunológicos. En humanos, los Tregs están implicados en la prevención de enfermedades autoinmunes, se encargan del mantenimiento de la auto-tolerancia, están implicados en la tolerancia feto-materna y también en la inmunidad contra tumor (81).

En el Alo-TPH, una vez infundidos los Linfocitos T con el injerto, éstos sufren una expansión fisiológica en un intento de ocupar el nicho linfohematopoyético vacío tras el acondicionamiento quimio/radioterápico. Dentro de estos LT, los Tregs sufren una expansión tímica en el periodo precoz post Alo-TPH, lugar donde se produce una selección positiva de células CD4+CD25+ con capacidad de adquirir actividad supresora (78,79). De hecho, diversos estudios en animales, han demostrado que esta proliferación/expansión de Tregs no tiene lugar en animales timectomizados, los cuales, tras un Alo-TPH sufren mayores tasas y severidad de EICR (82,83). De la

misma manera, los CD4+ vírgenes infundidos sufren una expansión periférica, pudiendo expresar rápidamente un fenotipo regulador (CD25+FoxP3) tras la estimulación por receptores T y TGF-beta (77).

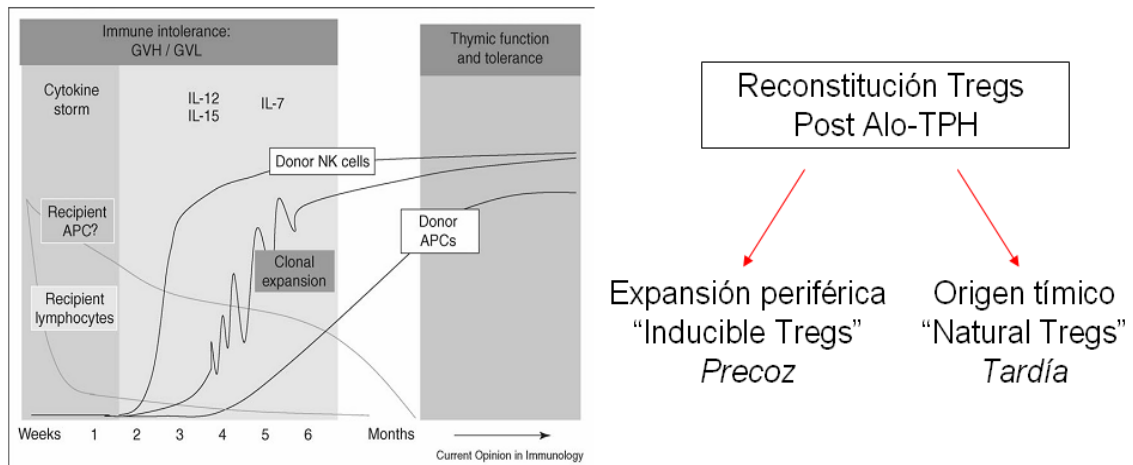


Figura 7. Reconstitución de Tregs post alo-TPH.

El porcentaje de Tregs infundidos en el injerto es escasa, y sin embargo, su expansión y proliferación en el Alo-TPH tras la infusión del injerto, es crucial para el devenir del mismo, ya que los Tregs son fundamentales para la reconstitución inmune derivada del donante post Alo-TPH. En este contexto, los Tregs permiten el control de los diferentes fenómenos inmunológicos, facilitando la alotolerancia y modulando la alorreactividad entre donante y receptor. Así, diversos estudios han intentado expandir esta población de Tregs *ex-vivo* (obteniendo y expandiendo Tregs de alta pureza para posterior infusión en el paciente) (84) o *in-vivo* mediante el uso de diferentes fármacos (rapamicina ó 5´Azacitidina)(85,86) en un intento por promover la actividad anti-EICR y a su vez manteniendo la anti-tumor (EICL).

Estos estudios se basan en su mayoría en la expansión de Tregs del donante (*ex-vivo* ó *in-vivo*). Sin embargo, modelos murinos sometidos a Alo-TPH han demostrado que, Tregs del receptor sobreviven a los acondicionamientos quimioterápicos agresivos, incluso que sufren una marcada expansión tras el Alo-TPH, al menos durante un periodo de tiempo. Estos Tregs provenientes del receptor, con actividad funcional, contribuyen a ocupar el nicho hematopoyético durante un periodo de tiempo, manteniendo la actividad que regula el sistema adaptativo y las respuestas inmunes (87).

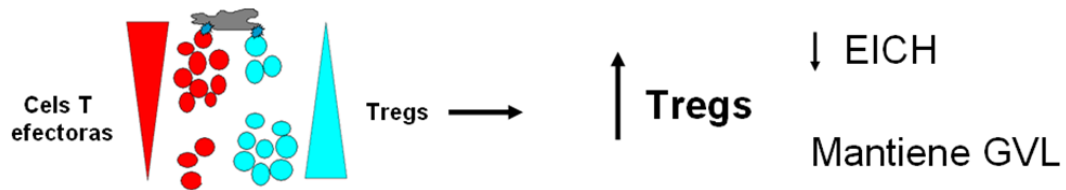


Figura 8. Esquema de la expansión de Tregs y el balance con las células efectoras, favoreciendo la mitigación de la EICR y manteniendo la EICL.

4. Hipótesis

La dinámica del quimerismo nos aporta información crucial para el manejo del Alo-TPH y en ocasiones puede determinar la toma de decisiones, como puede ser el manejo de la inmunosupresión o la infusión de linfocitos del donante, más aún cuando este análisis se realiza sobre LT. Mientras que un QC en LT asegura el injerto, aumenta las tasas de EICR y por consiguiente el efecto EICL, por el contrario, un QM en LT se asocia a mayores tasas de pérdida de injerto, menor EICR y por consiguiente teóricamente más recaída. Sin embargo, existen ocasiones en las que pacientes en QM desarrollan complicaciones como la EICR, o estando en QC no lo hacen, y es en estos supuestos en los que el análisis en nuevos subtipos celulares nos aporta información adicional para prevenir el desarrollo de determinados eventos. Se plantean así las siguientes hipótesis:

- 1) Los LA (CD25+) están implicados en el desarrollo de EICR. Así la consecución de QC en LA está asociada a una mayor tasa de EICR, y por tanto a un menor riesgo de recidiva, ya que una rápida expansión de LA derivados del donante es necesaria para este fenómeno.
- 2) Conocida la persistencia de una población de Tregs del receptor tras el acondicionamiento pre Alo-TPH, y que la expansión de Tregs derivada del donante es lenta, la persistencia de estos Tregs del receptor, es decir el QM en Tregs, minimiza el desarrollo de EICR.

5. Objetivos

El objetivo del presente trabajo consiste en el análisis de la dinámica del quimerismo en linajes leucocitarios: leucocitos activados (LA, CD25+) y T reguladores (Tregs, CD4+/CD25+), y su influencia en el desarrollo de complicaciones tras el Alo-TPH, así como sobre el éxito del mismo:

Objetivos primarios:

- 1) Análisis de la dinámica del quimerismo en LA y Tregs tras el Alo-TPH.
- 2) Correlación clínica de la dinámica del quimerismo en LA y Tregs con el desarrollo de EICR post Alo-TPH, así como con la tasa de recaída.
- 3) Valoración de la utilidad clínica del seguimiento del quimerismo en LA y Tregs.

Objetivos secundarios:

- 1) Análisis de los factores que afectan a la dinámica del quimerismo en LA y Tregs.
- 2) Análisis comparativo de la dinámica del quimerismo en LA y Tregs.

6. Material y métodos

6.1 Definiciones

- Injerto mieloide: recuento absoluto de neutrófilos de 0.5×10^9 /L o mayor durante 3 días consecutivos.
 - Injerto plaquetar: recuento absoluto de plaquetas de 20×10^9 /L o mayor durante 3 días consecutivos sin soporte transfusional.
 - QM, quimerismo mixto: presencia de patrones alélicos específicos de donante y receptor, detectables por STR con una sensibilidad del 1%. QM en linajes leucocitarios se definió como la presencia de más de un 5% células del receptor, con una pureza mínima de las muestras purificadas del 95%.
 - QC, quimerismo completo: ausencia de patrones alélicos específicos de receptor detectables por STR con un nivel de sensibilidad del 1% y del 5% para linajes leucocitarios.
 - QC temprano: obtención de QC (<1% de receptor en ST o MO y <5% de receptor en linajes) en el día + 30 o anterior.
 - QC tardío: obtención de QC (<1% de receptor en ST o MO y <5% de receptor en linajes) posterior al día + 30.
 - Fracaso del injerto: falta de prendimiento inicial (leucoplaquetar) de células originadas de la hematopoyesis del donante (88).
 - Rechazo del injerto: pérdida progresiva del injerto (sangre periférica y médula ósea) tras injerto hematológico, acompañado de QM con porcentajes crecientes de receptor y en ausencia de recaída (89).
- Remisión completa en LMA: 1) definida como remisión completa morfológica (<5% de blastos en médula ósea), ausencia de blastos con bastones de Auer o ausencia de enfermedad extramedular; 2) recuento de neutrófilos >1000 /mcl, plaquetas >100.000 /mcl e independencia transfusional (www.nccn.com, AML NCCN guidelines, Version 1.2015).

- Recaída de enfermedad en LMA: reaparición tras remisión completa de citopenias ó blastos leucémicos en sangre periférica o >5% de blastos en médula ósea, no atribuibles a otra causa, o reaparición de enfermedad extramedular.
- Remisión completa y recaída en SMD: de acuerdo a consenso IWG (90)
- Remisión completa y recaída en LAL: [www.nccn .com](http://www.nccn.com), NHL y HL NCCN guidelines, Version 2.2014
- Remisión completa y recaída en Mieloma Múltiple: [www.nccn .com](http://www.nccn.com), NHL y HL NCCN guidelines, Version 4.2015
- Remisión completa y recaída en Linfomas: [www.nccn .com](http://www.nccn.com), NHL y HL NCCN guidelines, Version 2.2015
- Diagnóstico y graduación de EICR: acorde con consensos internacionales publicados (91)(92).

6.2 Pacientes

Para el presente trabajo se utilizaron muestras y datos clínicos de pacientes sometidos a trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos por neoplasias hematológicas, en el servicio de Hematología del Hospital Universitario Gregorio Marañón. Se incluyeron en el estudio un total de 68 pacientes trasplantados consecutivamente desde de 2001 hasta de 2010 (Tabla 1).

La mediana de edad al trasplante fue de 44 años (rango 19-69 años, con un predominio de varones trasplantados (72%). En cuanto a los diagnósticos, el 38,2% estaban diagnosticados de leucemia aguda mieloide (LAM), el 17,6% síndromes mielodisplásico (SMD) o mielofibrosis (MF), el 17,6% leucemia aguda linfoblástica (LAL), el 16,2% linfoma y el 5,9% mieloma múltiple. El 67,6% de los pacientes estaban en remisión completa (RC) previo al Alo-TPH, de los cuales el 42,6% era la primera RC y el 25% era una segunda o más RC. El 42,6% de los pacientes habían recibido al menos 2 líneas de quimioterapia previo al trasplante, y un 20,6% habían recibido un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (Auto-TPH) previamente. El 64,7% de los donantes eran hermanos HLA idénticos al menos 10/10, mientras que sólo el 5,9% de los donantes no emparentados tenían una diferencia (identidad HLA 11/12) a nivel alélico. El 92,6% de los trasplantes se llevaron acabo utilizando sangre periférica como fuente de progenitores hematopoyéticos, y se utilizaron regímenes de acondicionamiento mieloablativos (MA) en el 67,6% de los trasplantes, con timoglobulina anti-timocito en los Alo-TPH MA de donante no emparentado (DNE).

	n	%
n	68	
Mediana de edad (rango)	44 (19-69)	
Genero (mujer/hombre)	19/49	
Diagnóstico		
Leucemia Aguda Mieloide	26	38,2
SMD/Mielofibrosis	12	17,6
Leucemia Aguda Linfoblástica	12	17,6
Linfoma	11	16,2
Mieloma Múltiple	4	5,9
Otros	3	4,4
Estado de la enfermedad		
1ª RC	29	42,6
>1ª RC	17	25,0
RP/Refractaria	22	32,4
Tratamientos previos		
<2 líneas de tratamiento	39	57,4
≥ 2 líneas de tratamiento	29	42,6
Auto-TPH previo	14	20,6
Donante		
Hermano HLA-idéntico	44	64,7
Donante no emparentado	24	35,3
10/10	4	5,9
11/11	1	1,5
11/12	4	5,9
12/12	15	22,1
Fuente de progenitores		
Sangre periférica	63	92,6
Médula ósea	5	7,4
Acondicionamiento		
MA	46	67,6
ICT-CFX (ATG)	15 (5)	22,1
Bux-Flu (ATG)	27 (12)	39,7
Otro	4	5,9
NMA	22	32,4
Flu-Mel	15	22,1
Bux-Flu	7	10,3
Profilaxis EICH		
MTX + CsA	68	100,0

Tabla 1. Características de los 68 pacientes trasplantados incluidos en el estudio y características de los trasplantes. SMD, síndrome mielodisplásico; 1ª RC, primera remisión completa; >1ªRC, remisión completa tras tratamiento por recaída tras una 1ª RC; RP, remisión parcial; MA, mieloablatoivo; ICT, irradiación corporal total; CFX, ciclofosfamida; ATG, globulina antitímocito; BUX, busulfán; Flu, fludarabina; EICH, enfermedad injerto contra receptor; MTX, metotrexate; CsA, ciclosporina.

El análisis del quimerismo se realizó sobre muestras de los pacientes citados previamente. Debido al escaso número de leucocitos en el periodo precoz tras Alo-TPH, se requiere un volumen muy alto de sangre para obtener una celularidad suficiente para obtener muestras purificadas de los diferentes linajes leucocitarios, en especial los CD4+/CD25+. Se estableció así un orden en cuanto a los linajes leucocitarios a analizar en el laboratorio a partir de las muestras obtenidas: primero muestras para selección CD25+ (LA) y posteriormente para CD4+/CD25+ (Tregs), dependiendo de la celularidad de la muestra del paciente en ese momento determinado, y por tanto del volumen requerido. Así, únicamente se pudo realizar el análisis del quimerismo en ambos linajes de manera conjunta (LA y Tregs) en 37 pacientes (Tabla 2).

	n	%
n	37	
Diagnóstico		
Leucemia Aguda Mieloide	17	45,9
SMD/Mielofibrosis	5	13,5
Leucemia Aguda Linfoblástica	9	24,3
Linfoma	7	18,9
Mieloma Múltiple	3	8,1
Otros	1	2,7
Estado de la enfermedad		
1ª RC	22	59,5
>1ª RC	8	21,6
RP/Refractaria	7	18,9
Donante		
Hermano HLA-idéntico	28	75,7
Donante no emparentado	9	24,3
10/10	1	2,7
11/11	1	2,7
11/12	1	2,7
12/12	6	16,2
Fuente de progenitores		
Sangre periférica	35	94,6
Médula ósea	2	5,4
Acondicionamiento		
MA	26	70,3
NMA	11	29,7
Profilaxis EICR		
MTX + CsA	37	100,0

Tabla 2. Características de los 37 pacientes sobre los que se realizó en análisis del quimerismo en SP, LT, LA y Tregs, con las características de los trasplantes

6.3 Material y métodos

El análisis del quimerismo en MO se realizó de forma programada durante el seguimiento post Alo-TPH en los días +30, +60, +100, +180 y +360, o en cualquiera de los momentos en que se realizase un estudio de MO por cualquier otro motivo, como por ejemplo una sospecha de recaída.

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron cada semana a partir del día +15 post Alo-TPH, y posteriormente a esta fecha con una frecuencia quincenal hasta la consecución del quimerismo completo (QC). Una vez alcanzado el QC en cualquiera de los linajes, en la siguiente determinación no se ha llevado a cabo el análisis del quimerismo sobre este subtipo celular, asumiendo que si no existen datos que sugieran pérdida del injerto o recaída, el paciente persiste en QC en el mismo. En esta situación sólo se realizó el quimerismo en sangre total (SP). El orden para la realización del análisis del quimerismo tanto en SP como en linajes leucocitarios fue así:

- 1º Quimerismo en SP y en MO
- 2º Quimerismo en CD3+
- 3º Quimerismo en CD25+
- 4º Quimerismo en CD4+/CD25+

Dado que el proceso completo de procesamiento de la muestra, con separación inmunomagnética y posterior PCR se realiza en 72 horas, como norma habitual sólo lunes y martes se recibieron las muestras y se realizó el proceso de separación inmunomagnética. A partir de ahí, se realizó la PCR, electroforesis capilar y posterior análisis bioinformático en los 2 días siguientes, transcurriendo un máximo de 4 días desde la recepción de la muestra hasta el informe de los resultados.

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES
Purificación de ADN y separación inmunomagnética	Purificación de ADN y separación inmunomagnética	Realización de PCR y electroforesis capilar	Análisis bioinformático del quimerismo	Entrega de resultados a clínicos

Tabla 3. Cronograma de trabajo semanal

6.4 Muestras

Se realizó el análisis del quimerismo en 725 muestras de SP, 236 de médula ósea, 219 de Linfocitos T, (CD3+), 218 muestras de LA (CD25+) y 113 de Tregs (CD4+/CD25+). La mediana de muestras por paciente fue de 19 (rango, 4-76), siendo 9 en SP (rango, 2-38), 3 en MO (rango, 0-10), 2 en LT (rango, 1-38), 2 en LA (rango, 1-38) y 2 en Tregs (rango, 1-12).

6.5 Separación inmunomagnética CD3+, CD25+ y CD4+/CD25+.

La primera parte del proceso de separación inmunomagnética es equivalente para leucocitos CD3+, CD25+ y CD4+/CD25+, y consiste en la separación de células mononucleadas de la muestra de sangre total. La muestra procesada debe de ser fresca (menos de 8h desde la extracción) y estar conservada a temperatura ambiente en tubos de heparina de litio (tapón verde) preferiblemente. El volumen de sangre necesario se calculó en función del número de leucocitos para obtener 10^7 células mononucleadas para cada linaje a purificar.

Una vez calculado este volumen, la muestra se traslada a un tubo Falcon de 50 ml, añadiendo PBS (*Innogenetic*) hasta completar 35 ml. Tras mezclar la muestra, se añaden 10 ml de Ficoll (*Comercial Racer LN0100*) en el fondo del tubo con una pipeta de 10 ml, y se centrifuga durante 20 minutos a 1700 rpm (500g). La capa de CMN se pasa a un tubo de 15 ml, intentando coger la menor cantidad posible de plasma y

Ficoll, añadiendo hasta 10 ml de PBS. Tras mezclar y centrifugar 10 min a 1200 rpm (300g) se descarta el sobrenadante prosiguiendo con las células para la separación inmunomagnética.

6.5.1 Separación inmunomagnética CD3+, CD25+.

La separación inmunomagnética se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*Miltenyi Biotec, MACS isolation Kit*). En el caso de células CD3+ y CD25+ este proceso es equivalente.

Primeramente se resuspende la muestra obtenida tras separación por Ficoll en tubos distintos de 5ml para cada uno de los subtipos a purificar, completando con *MACS Running Buffer* a 4°C hasta 80µl, y se añade a cada tubo la inmunoesfera magnética correspondiente según el subtipo celular:

- 20µl de CD3 (*Miltenyi Biotec*)
- 10µl de CD25 (*Miltenyi Biotec*)

Se incuba en nevera durante 15 minutos a 1 a 4°C, y se añade 1,5ml (x10-x20) de *MACS Running Buffer* a 4°C con posterior agitación por inversión. Tras centrifugar 10 min a 1200 rpm (300g) se descarta el sobrenadante con pipeta Pasteur de vidrio y se resuspende el pellet en 500µl de *MACS Running Buffer*, realizando un mezclado posterior.

Una vez finalizado este proceso, la purificación inmunomagnética se realiza de forma automatizada en autoMACS PRO. El programa utilizado para la selección CD3+ y CD25+ es "POSSELD" (doble selección positiva, con 2 columnas inmunomagnéticas) con programa de lavado "RINSE". Al finalizar, se colecta el tubo de la **FRACCIÓN POSITIVA**, desechando la Fracción Negativa.

6.5.2 Selección CD4+/CD25+

Para la selección de CD4+/CD25+ se utiliza un procedimiento más complejo, que consta de 2 pasos: un primer paso en el que se realiza la primera selección negativa de células no-CD4+, y una posterior selección positiva CD25+, atendiendo al siguiente esquema.

Partiendo de nuevo de la muestra obtenida tras separación por Ficoll, se resuspende el pellet en 90µl de buffer para 10^7 células, añadiendo 10µl de un cocktail de anticuerpos anti no-CD4+ (*CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail*) con anti CD8, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123, TCRγ/ y CD235a (*Glycophorin A*), y con 20µl de microesferas anti-biotina magnetizadas. Una vez mezclado, se incuba durante 15 minutos a 1-4 °C. Tras centrifugar 10 min a 1200 rpm (300g) se descarta el sobrenadante con pipeta Pasteur de vidrio y se resuspende el pellet en 500µl de *MACS Running Buffer*, con mezclado posterior.

La purificación inmunomagnética se realiza de forma automatizada en autoMACS PRO. El programa utilizado en este caso es “DEPL05” (*Dep105: Depletion*), con colecta posterior de la **FRACCIÓN NEGATIVA** (enriquecida en células CD4+), y desechando la fracción positiva.

En un segundo paso, sobre esta muestra enriquecida se lleva a cabo un marcaje directo con microesferas anti CD25+ (mismo procedimiento que la selección CD3+ y CD25+), para posteriormente realizar una retención de la **FRACCIÓN POSITIVA** en un sistema de doble columna, obteniendo así una muestra enriquecida CD4+/CD25+.

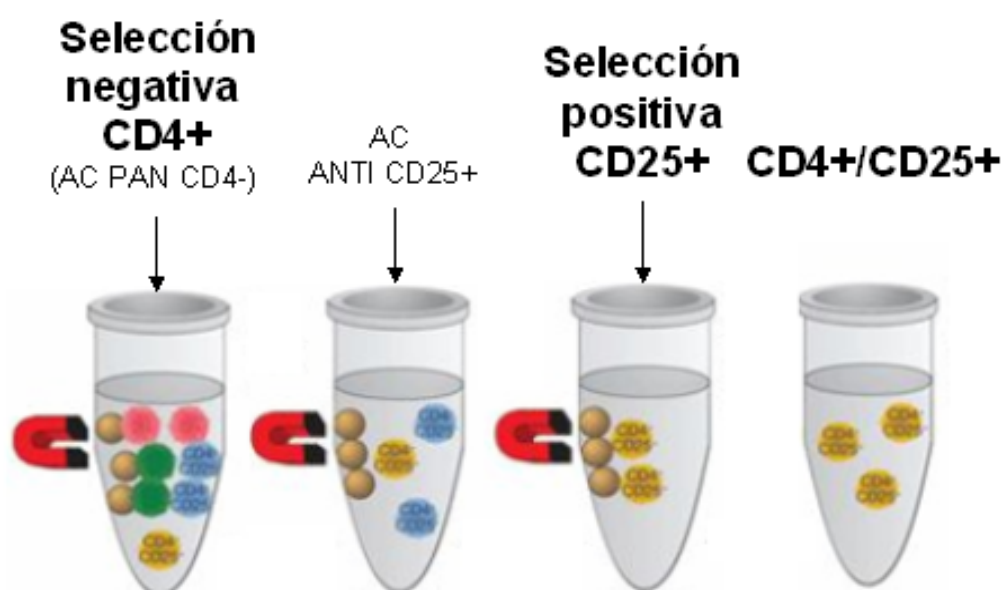


Figura 9. Esquema del procedimiento realizado para la purificación inmunomagnética de Tregs CD4+/CD25+.

6.6 Estudio de factibilidad para el análisis del quimerismo en CD4+/CD25+ Tregs post Alo-TPH.

Hasta la fecha, no se ha reportado la realización del quimerismo hematopoyético post Alo-TPH en linfocitos CD4+/CD25+ Tregs. Los kits comerciales para realizar una selección inmunomagnética en este subgrupo celular han basado sus resultados en muestras no patológicas de sangre periférica obtenidas de individuos sanos. Por tanto, dada la escasa cantidad de Tregs en el periodo post Alo-TPH, existía la duda razonable de la factibilidad de dicho procedimiento que, como se ha comentado anteriormente, requiere una doble selección negativa-positiva.

Se llevó así a cabo un estudio piloto de factibilidad para quimerismo en linfocitos Tregs(CD4+/CD25+). En dicho estudio se incluyeron 8 pacientes sometidos a Alo-TPH (Tabla 5), de los que 3 eran NMA y 5 MA. Se analizaron muestras de sangre periférica (SP) y linajes leucocitarios (linfocitos T (LT) y linfocitos Treg) obtenidas quincenalmente hasta la consecución de quimerismo completo (QC) y trimestralmente

en SP a partir de entonces. El análisis de quimerismo se realizó mediante PCR de microsatélites (STR; AmpFISTR SGM Plus; Applied Biosystems) sobre ADN de SP y linajes leucocitarios (LT CD3+ y Treg CD4+/CD25+) purificados mediante tecnología inmunomagnética (Miltenyi Biotec).

Una vez realizada la separación inmunomagnética, la pureza de las muestras de Tregs (CD4+/CD25+) fue superior al 95% (Figura 10), con lo que un porcentaje de receptor superior al 5% fue considerado quimerismo mixto (QM) en estos linajes leucocitarios.

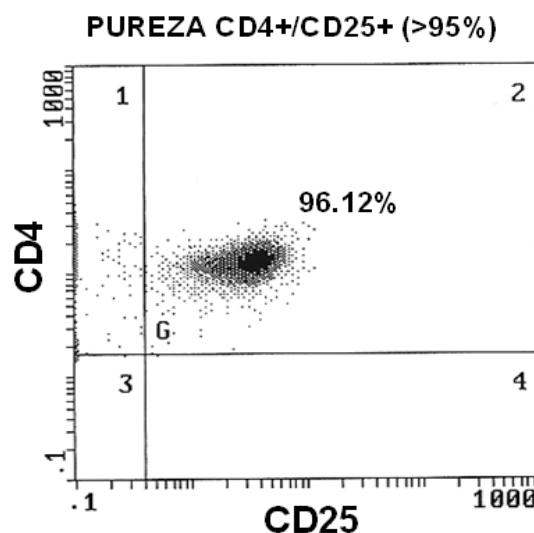


Figura 10. Ejemplo de pureza de una muestra de Tregs (CD4+/CD25+) por citometría de flujo tras doble selección inmunomagnética

El análisis del quimerismo en Tregs se comparó con el obtenido en sangre total y LT, actuando éstos como control positivo, y descartando contaminación de las muestras. En los 8 pacientes se obtuvo una cantidad de ADN de linfocitos Tregs suficiente para poder realizar el análisis de quimerismo por PCR-STR. Los resultados de la cuantificación del quimerismo post TPH se presentan en la Tabla 4.

UPN	QUIMERISMO DÍA +30		
	SP	LT	TREGS
407	0	6,9	9,21
412	0	0,5	9,7
191	0	0	0
429	0	0	0
430	0	33,4	65,8
413	0	0	0
417	0	0	0
428	0	0	0

Tabla 4. Cuantificación del quimerismo (porcentaje de celularidad del receptor) en SP, LT y Tregs en el día +30 post Alo-TPH en los 8 pacientes incluidos en el estudio piloto.

Mediante dicho estudio se comprobó que 1) pese a la escasa concentración de Tregs post Alo-TPH, la realización de una doble selección inmunomagnética (CD4+/CD25+), obtiene una cantidad de ADN suficiente para el análisis del quimerismo por STR-PCR; 2) la cuantificación del quimerismo en Tregs no sigue la misma dinámica que en LT en determinados pacientes, haciendo así atractivo su análisis.

6.7 Purificación de ADN

La muestra remanente obtenida de la separación inmunomagnética, siguiendo el protocolo, se mezcla y pasa a un tubo Eppendorf de 1,7mL. Tras centrifugarla durante 1 min a 14.000 rpm (13.000g) se retira el sobrenadante hasta que el pellet se queda seco con una pipeta p1000 (Gilson p1000), y posteriormente se procede con la lisis (en este momento se puede congelar el pellet para un uso posterior).

Para la lisis, se añaden al pellet 50µl de Proteinasa K 100µg/ml (*Sigma P-2308*) y se mezcla bien con la micropipeta con una incubación posterior de un mínimo de 2 horas a 56°C (*Thermomixer Compact; Eppendorf*). A continuación, tras un pulso de centrífuga para concentrar el volumen en el fondo del tubo, se incuba durante 10 min a 95°C (*Thermomixer Compact; Eppendorf*) para inactivar la proteinasa K. Se culmina el

proceso con una centrifugación de 1 min a 14.000 rpm (15.000g) para recoger el sobrenadante procurando no arrastrar nada del debrís presente en el pellet (puede inhibir la reacción de la PCR).

En cuanto a las muestras de sangre y médula ósea, las cuales no llevan proceso de separación inmunomagnética, tras el lisado celular se añaden 20 µl de proteasa (Qiagen ADN), con 200µl de Buffer AL a la muestra. Se mezcla durante 15s en vórtex y se incuba 10 min a 56°C. Tras un pulso de centrifuga, se añaden 200µl de etanol (96-100%) con mezcla posterior en vórtex y pulso de centrifuga.

Una vez realizada la lisis, ya sea del producto de la separación inmunomagnética como de la ST o MO, se aplica la mezcla (~620µl) sobre la columna (*QIAamp spin column*) sin tocar el borde ni el filtro inferior. Tras su cierre se centrifuga 1 min a 8.000 rpm (3000g), se elimina el eluído, y se coloca de nuevo la columna en un tubo colector de 2 ml, añadiendo 500µl de Buffer AW1 a la columna con posterior centrifugado de 1 min a 8.000 rpm (3000g). Tras eliminar el eluído se repite este proceso con 500µl de Buffer AW2, eliminando de nuevo el eluído del tubo colector.

Para finalizar, se coloca la columna en un eppendorf de 1,5ml limpio, añadiendo 100µl de agua DEPC (50µl para muestras con <1µg ADN) a la columna, dejándolo 5 min a TA. Se realiza una nueva centrifugación de 1 min, a 8.000 rpm (3000g), tirando posteriormente la columna y conservando el tubo eppendorf.

Una vez finalizado el proceso se midió la concentración de ADN de las muestras en el espectrofotómetro Nanodrop.

6.8 Realización de la PCR

Una vez obtenido el ADN de los linajes purificados se utiliza para la PCR de microsatélites la Multiplex STR-PCR AmpFISTR SGM Plus kit (Applied Biosystems), que contiene 10 locus STR más el gen de la amelogenina (X-Y) marcados tres colores (azul 5-FAM, verde JOE y amarillo NED).

Cada muestra de ADN a amplificar se diluye a 0,1 ng/μl (Tabla Dilución SGM). Posteriormente se prepara la MasterMix en la “zona de pre-PCR”, utilizando las pipetas específicas con los kits AmpFISTR SGM Plus PCR Amplification Kit (Applied Bio 4307133) y TaqMan PCR Master Mix (Applied Bio 4304437).

Se prepara la MasterMix en tubo eppendorf de 1,5 ml para procesar hasta 42 muestras y en eppendorf de 2,0 ml para hasta 55 muestras, con un cálculo de volumen en exceso para compensar posibles errores de pipeteo. Para cada tubo de PCR se dispensan 30 μl de MasterMix por, y se añaden 20 μl de cada muestra, para volumen final de 50 μl.

El programa del termociclador es el siguiente:

HOLD	95 °C	11 min
CYCLE	94 °C,	1 min; 59 °C 1 min; 72 °C 1min ; x 28
HOLD	60 °C	45 min
HOLD	25 °C	Forever

6.9 Análisis de los resultados.

Una vez finalizada la PCR, se realiza la electroforesis capilar en un secuenciador automático de ADN (ABI Prism 3100; Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis del resultado de la electroforesis capilar se lleva a cabo con el programa informático Genemapper V 4.0. Con él, y previo a la primera determinación

del quimerismo, se estudian las muestras de donante y receptor para identificar marcadores STR que permitan diferenciar la hematopoyesis de donante (D) y receptor (R), es decir, que presentan alelos (picos) específicos de receptor que no coincidan con ningún alelo (pico) de donante. Se diseñan a continuación fórmulas para el cálculo del quimerismo en función de la constelación de alelos (picos) para cada marcador (Figura 11).

Mediante esta técnica se consigue detectar ADN de ST ó MO, ya sea de Donante o de Receptor, con una sensibilidad del 1%, la cual puede llegar a 0,01% si se utilizan tiempos de inyección larga durante la electroforesis capilar (93). En cuanto a los linajes leucocitarios, tras el separación inmunomagnética, la sensibilidad quedó establecida en el 5%. Así, se definió QM como la presencia de ADN del receptos en >1% si se trataba de ST o MO, y >5% si se trata de alguno de los linajes leucocitarios.

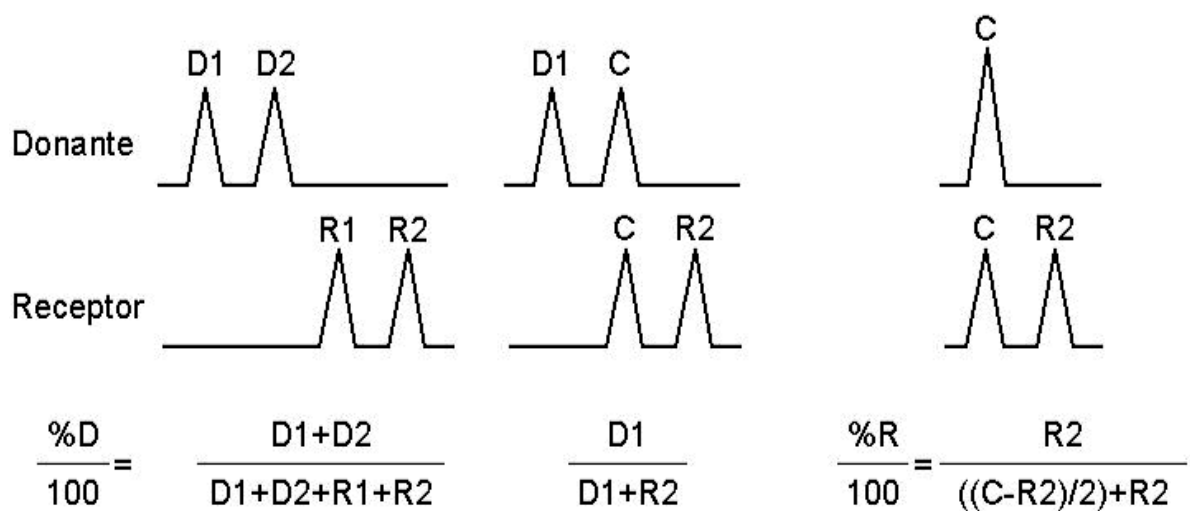


Figura 11. Ejemplo gráfico de picos donante y receptor, y de la fórmula para el cálculo del quimerismo

6.10 Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron como mediana y media. Las variables cualitativas se expresaron como porcentaje y frecuencia. El análisis de normalidad se llevó a cabo con el test de Kolmogorov–Smirnov. Las variables cuantitativas se compararon con el test no-paramétrico Mann Whitney rank-sum, y las variables cualitativas (dos a dos) con el test exacto de Fisher. Para el análisis multivariante se utilizó el modelo de regresión de Cox. El riesgo relativo (relative hazard rates (CI 95%) se calculó, y se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos utilizando el test de Wald. Todos los test estadísticos se llevaron a cabo con un valor de corte de dos colas, considerando estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

La estimación de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG) se calculó usando el método Kaplan-Meier. Las estimaciones de quimerismo completo (QC), enfermedad injerto contra huésped agudo y crónico se calcularon usando curvas de incidencia acumulada. La comparación de curvas de supervivencia para diferentes grupos se llevó a cabo mediante el test log-rank.

El análisis estadístico se realizó usando SPSS v18 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), excepto para las incidencias acumuladas que se calcularon usando R v2.15.0 *Statistical Programming Language*.

7. Resultados

El análisis del quimerismo reveló que de los 68 pacientes analizados, 59 adquirieron QC en MO (87,6%) con una mediana de 46,5 días, 61 pacientes en SP (89,7%) con una mediana de 38,6 días, 60 pacientes en LT (88,2%) con una mediana de 48,7 días, 61 pacientes en LA (89,7%) con una median de 48,7 días y 34 pacientes de los 37 evaluados en Tregs (34/37, 91%) con una mediana de 47 días. Trece pacientes no adquirieron QC en uno o más de los tipos de muestras analizadas en el tiempo de seguimiento (Tabla 4). De ellos, 12 pacientes fueron censurados antes de adquirir el QC (1 fracaso de injerto, 6 recaídas, 1 ILD y 4 éxitus) y 1 paciente mantuvo un quimerismo mixto estable durante el seguimiento sin evidencia de rechazo del injerto ni recaída (Tabla 5).

Paciente	Status	Causa	Día	QUIMERISMO			
				MO	SP	LT	LA
1	Censurado	Éxitus (sepsis)	+52	QM	QC	QC	QC
2	Censurado	Rechazo injerto	+53	QM	QM	QM	QM
3	Censurado	Recaída	+58	QM	QM	QM	QM
4	Censurado	Recaída	+63	QM	QC	QC	QC
5	Censurado	Éxitus (sepsis)	+66	QC	QC	QM	QM
6	Censurado	Recaída	+84	QM	QC	QC	QC
7	Censurado	Recaída	+86	QC	QM	QC	QC
8	Censurado	Recaída	+90	QM	QM	QM	QM
9	Censurado	Éxitus (sepsis)	+102	QC	QM	QM	QM
10	Censurado	Éxitus (sepsis)	+105	QM	QC	QC	QC
11	Censurado	ILD	+113	QM	QM	QM	QM
12	Censurado	Recaída	+334	QC	QC	QM	QC
13	No censurado	QM estable	+1729	QM	QM	QM	QM

Tabla 5. Estado del quimerismo en el momento de la censura o último día de seguimiento en SP, MO, LT y LA, y causa de exclusión de los 13 pacientes que no adquirieron el QC. QM, quimerismo mixto; QC, quimerismo completo; ILD, infusión de linfocitos del donante, MO, médula ósea; SP, sangre periférica; LT, linfocitos T; LA linfocitos activados.

7.1 Dinámica del quimerismo post Alo-TPH

El análisis del quimerismo se realizó sobre una cohorte de 68 pacientes sometidos a Alo-TPH de manera consecutiva. Como se mencionó en apartados anteriores (ver Material y Métodos), para el análisis del quimerismo en linajes leucocitarios (LT, CD3+; LA, CD25+; y Tregs, CD4+/CD25+) se requiere un elevado volumen de sangre del paciente. Así, sólo en 37 pacientes se obtuvo muestra suficiente para realizar el análisis del quimerismo en SP, LT, LA y Tregs de manera conjunta, mientras que en 68 pacientes se obtuvo muestra suficiente para analizar el quimerismo en SP, LT y LA. Por este motivo, el análisis del quimerismo en Tregs (CD4+/CD25+) y LA (CD25+) se presentan de manera separada.

7.2 Dinámica del quimerismo en Tregs

En el análisis de la dinámica de consecución de QC en Tregs (n=37), se observó la existencia de diferencias en los primeros 100 días cuando se comparó con SP, LT y LA (Figura 5), con un retraso en la consecución del mismo. La media de días para alcanzar dicho QC fue de 51.2 para los Tregs, 36.8 días para la SP, 46.7 días para LT y 47.0 para LA, observándose que estas diferencias fueron estadísticamente significativas cuando se comparó a los Tregs con la SP ($p=0,000$), LT ($p=0,001$) y LA ($p=0,013$) (Figura 12).

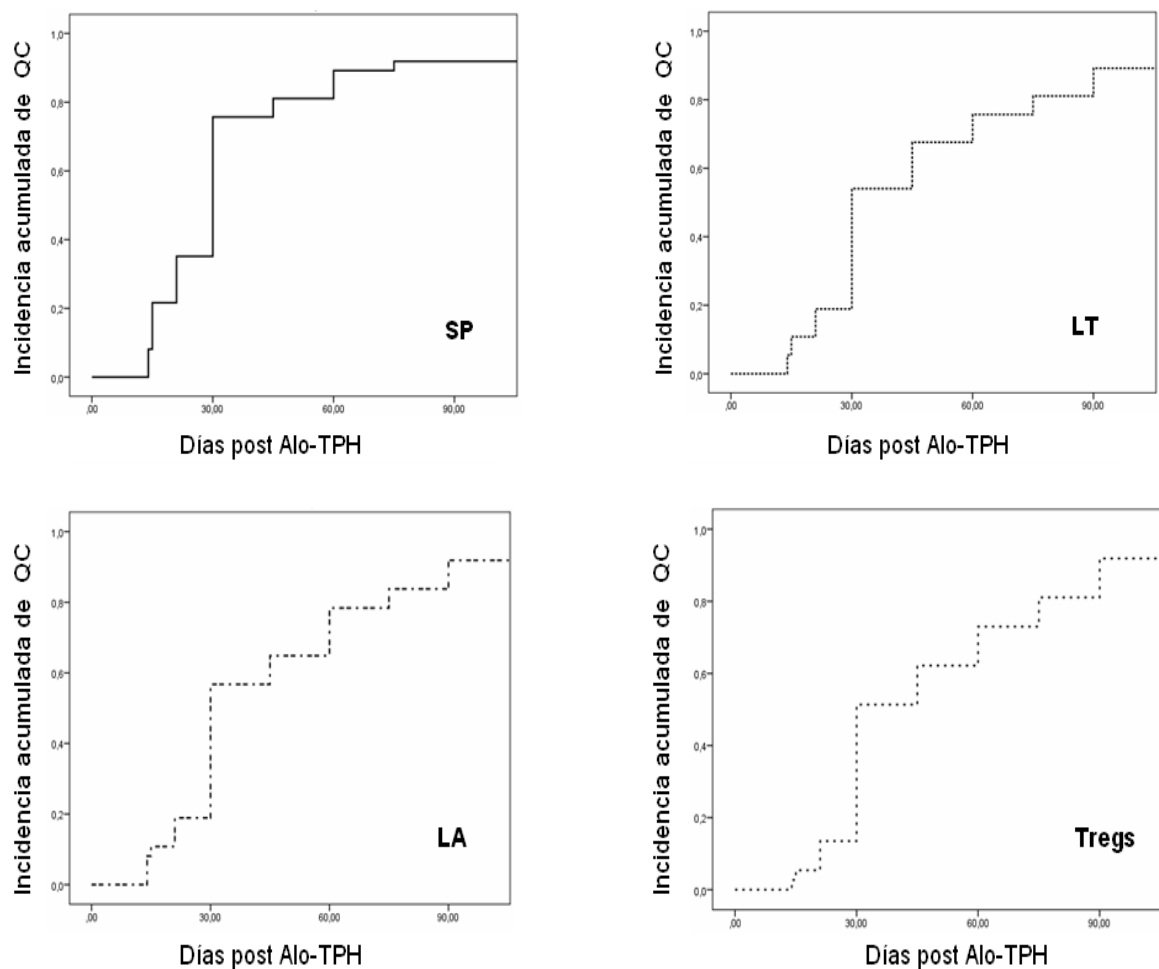


Figura 12. Incidencia acumulada de QC en SP, LT, LA y Tregs en los primeros 100 días del Ato-TPH. Pese a que existe un retraso general en la consecución del QC en Tregs en los días +30, +60 y +90 comparado con el resto de series, este se puede considerar más importante en el día +30.

El 51% de los pacientes alcanzó un QC en Tregs en el día +30, mientras que el porcentaje de QC en ese mismo momento del trasplante fue del 75,7% en SP, 64% en LT y 56,8% en LA. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre Tregs vs SP vs LT pero no cuando Tregs se comparó con LA. En el día +60, aunque se mantuvieron diferencias, éstas perdieron su significación estadística, y en el día +90 no se observaron diferencias.

En el análisis cuantitativo del quimerismo en Tregs, medido como porcentaje medio de celularidad del receptor en el día +30, +60 y +90, se observó que éste fue mayor en Tregs que en LT, LA y SP, únicamente con significación estadística en el día +30 y +60 y cuando se comparó con SP (Figura 13).

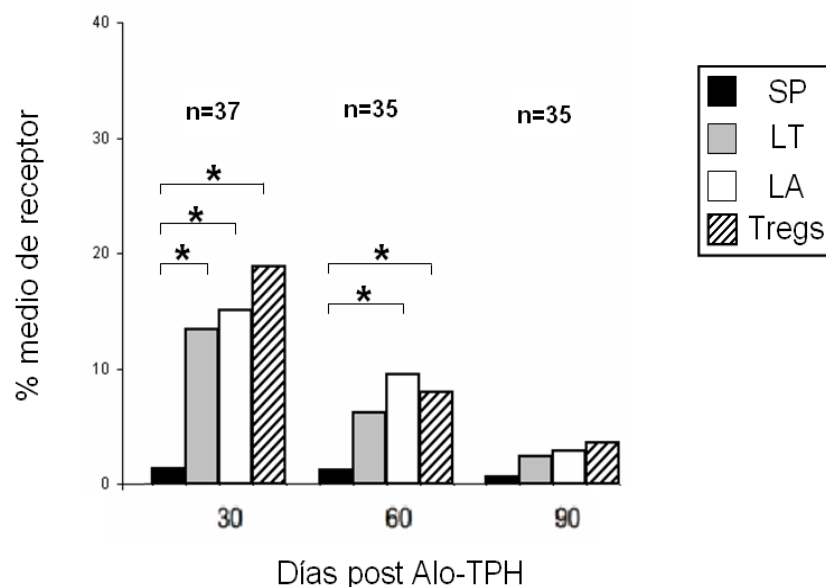


Figura 13. Porcentaje medio de receptor en SP, LT, LA y Tregs en diferentes momentos post Alo-TPH (día +30, +60 y +90) durante los 3 primeros meses post Alo-TPH en la cohorte completa $n=37$. * Diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$).

7.3 Dinámica del quimerismo en Leucocitos activados, LA

El análisis de la dinámica del quimerismo en LA sobre los 68 pacientes demostró diferencias en los primeros 100 días cuando se comparó con la SP, LT. (Figura 14, n=68). Los LA mostraron una adquisición del QC significativamente más tardía cuando se compararon con la SP ($p=0,042$). Los LT mostraron una dinámica intermedia entre SP y LA, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,12$ y $p=0,71$, respectivamente).

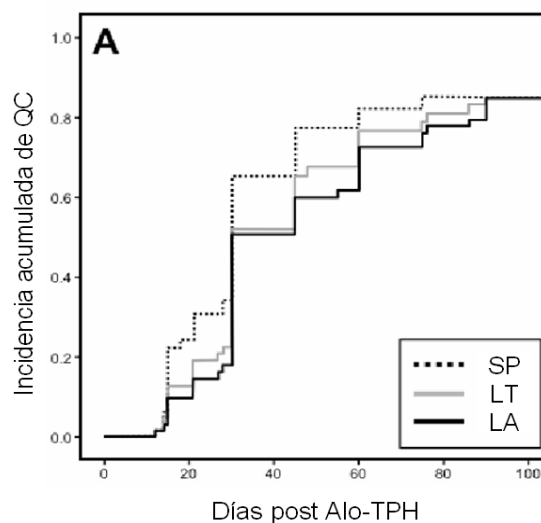


Figura 14. Incidencia acumulada de QC en los primeros 100 días del trasplante en SP, LT y LA (n=68). Los LA mostraron tiempos hasta la adquisición del QC estadísticamente superiores a los de SP ($p=0.042$). Los LT mostraron una dinámica de adquisición de QC intermedia entre SP y LA, sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0.12$ y $p=0.71$, respectivamente)

En este análisis se observó una asociación entre altas proporciones de receptor (QM en alta proporción) con un retraso en la consecución del QC. De hecho, el porcentaje de receptor en LT y LA fue significativamente mayor que en SP durante el seguimiento post Alo-TPH (Figura 15). En cuanto a los datos de prendimiento, es interesante también que no se observaron diferencias en los recuentos celulares entre pacientes que adquirieron QC de manera temprana (antes del día +30) o tardía en SP, LT y LA.

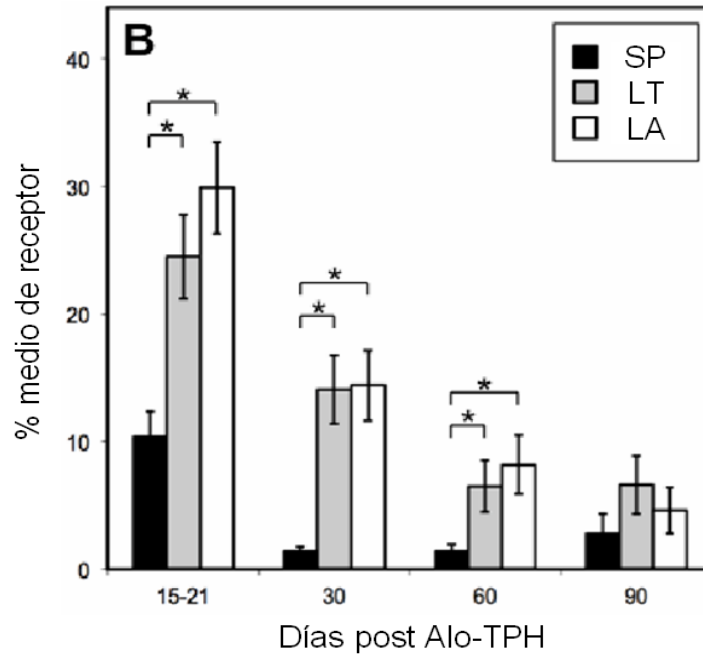


Figura 15. Media del porcentaje de células del receptor en SP, LT y LA (n=68) en diferentes momentos post Alo-TPH (día +15-21, +30, +60, +90) durante los 3 primeros meses post Alo-TPH en la cohorte completa. *Diferencias estadísticamente significativas entre muestras para cada día ($p < 0.05$): día 5-21: SP vs. LT $p < 0.001$, SP vs. LA $p < 0.001$; día +30: SP vs. LT $p < 0.001$, SP vs. LA $p < 0.001$; día +60: AP vs. LT $p = 0.017$, SP vs. LA $p = 0.004$.

7.4 Factores que influyen en la dinámica del quimerismo y la consecución de QC

7.4.1 Tregs

En el análisis de la influencia de los posibles factores que afecten sobre la dinámica del quimerismo Tregs, sobre los 37 pacientes analizados (Tabla 6, n=37), se observó que, al igual que en la cohorte completa de 68 pacientes, pacientes con enfermedades linfoides y pacientes que no recibieron fludarabina como parte del acondicionamiento tuvieron una mayor probabilidad de alcanzar el QC en Tregs en el día +30 pero no en el +60. A diferencia de la dinámica de consecución de QC en LA, LT y SP, la consecución de QC en Tregs no se observó un impacto por el número líneas de tratamiento previo al Alo-TPH.

		Tregs					
		Día +30			Día +60		
		QC (n=19)	QM (n=18)	p	QC (n=27)	QM (n=7)	p
Diagnóstico							
	Linfoide	12 (63,2)	3 (16,7)	0.05*	12 (44,4)	1 (14,3)	0,153
	Mieloide	7 (36,8)	15 (83,3)		15 (55,6)	6 (85,7)	
Estado de enfermedad							
	RC	11 (57,9)	10 (55,6)	0.574	14 (51,9)	6 (85,7)	0.115
	no RC	8 (42,1)	8 (44,4)		13 (48,1)	1 (14,3)	
Tratamiento previos							
	<2	11 (57,9)	14 (77,7)	0.153	17 (62,9)	6 (85,7)	0.115
	>=2	8 (42,1)	4 (22,3)		10 (37,1)	1 (14,3)	
Acondicionamiento							
	MA	12 (63,2)	11 (61,1)	0.583	14 (51,9)	6 (85,7)	0.115
	NMA	7 (36,8)	7 (38,9)		13 (48,1)	1 (14,3)	
ATG en acondicionamiento							
	recibido	5 (26,3)	3 (16,7)	0.379	6 (22,2)	0 (0)	0,22
	no recibido	14 (73,7)	15 (83,3)		21 (77,8)	7 (100)	
FLU en acondicionamiento							
				0.074			
	recibido	12 (63,2)	16 (88,9)	*	21 (77,8)	6 (85,7)	0.550
	no recibido	7 (36,8)	2 (11,1)		6 (22,2)	1 (14,3)	
Donante							
	hermano	12 (63,2)	11 (61,1)	0,583	14 (51,9)	6 (85,7)	0.115
	no-relacionado	7 (36,8)	7 (38,9)		13 (48,1)	1 (14,3)	

Tabla 6. Análisis de la influencia de diferentes factores sobre la dinámica del quimerismo en Tregs

7.4.2 Leucocitos activados, LA

En cuanto al análisis de la influencia de los posibles factores que afecten sobre la dinámica del quimerismo en SP, LT y LA (Tabla 7, n=68), se observó que, pacientes con enfermedades linfoides, pacientes con dos ó más líneas de tratamiento previo al Alo-TPH y pacientes que no recibieron fludarabina como parte del acondicionamiento tuvieron una mayor probabilidad de alcanzar el QC en SP, LT y LA en el día +30 y +60, con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7). Adicionalmente se observó que una mayor proporción de pacientes con enfermedades linfoides habían recibido más de una línea de quimioterapia previo al Alo-TPH (72.4% con >1 línea de QT vs. 27.6% con 1 línea de QT; $p<0.001$), hecho que podría darse como un factor de confusión. Aún así, estas asociaciones no se mantuvieron en el análisis multivariante de manera estadísticamente significativa.

	SP						LT						LA					
	Día +30			Día +60			Día +30			Día +60			Día +30			Día +60		
	OC (n=48)	OM (n=20)	P	OC (n=48)	OM (n=11)	P	OC (n=38)	OM (n=32)	P	OC (n=44)	OM (n=15)	P	OC (n=38)	OM (n=32)	P	OC (n=41)	OM (n=18)	P
Edad del paciente (años)	42	47	0.17	44	45	0.69	41	46	0.11	45	43	0.56	42	46	0.14	44	44	0.88
Género																		
Mujer	33 (68.0)	16 (80)	0.14	34 (70.8)	9 (81.8)	0.37	10 (27.0)	9 (28.1)	0.59	31 (70.5)	12 (80)	0.36	10 (27.0)	9 (28.1)	0.59	31 (75.6)	12 (68.7)	0.34
hombre	15 (31.2)	4 (20)		14 (29.2)	2 (18.2)		28 (72.2)	23 (71.9)		13 (29.5)	3 (20)		28 (72.2)	23 (71.9)		10 (24.4)	8 (33.3)	
Diagnóstico																		
Linfoma	24 (50)	5 (25)	0.043*	23 (47.9)	1 (9.1)	0.012*	22 (61.1)	7 (21.9)	0.001*	22 (50)	2 (13.3)	0.012*	21 (55.3)	8 (25)	0.005*	21 (51.2)	3 (16.7)	0.012*
Mieloma	24 (50)	15 (75)		25 (52.1)	10 (90.9)		14 (36.9)	25 (78.1)		22 (50)	13 (86.7)		15 (41.7)	24 (75)		20 (48.6)	15 (83.3)	
Diagnóstico																		
Aguda	20 (50.3)	11 (55)	0.5	20 (50.3)	7 (63.6)	0.52	19 (52.0)	20 (62.5)	0.28	24 (54.5)	11 (73.3)	0.16	19 (52.0)	20 (62.5)	0.28	22 (53.7)	13 (72.2)	0.14
otros	20 (41.7)	9 (45)		20 (41.7)	4 (36.4)		17 (47.2)	12 (37.5)		20 (45.5)	4 (26.7)		17 (47.2)	12 (37.5)		19 (46.3)	5 (27.8)	
Tratamiento previo																		
<2	22 (45.8)	17 (85)	0.003*	24 (50)	11 (100)	0.001*	20 (55.6)	23 (71.9)	0.12	21 (47.7)	14 (93.3)	0.001*	13 (36.1)	26 (81.2)	<0.001*	18 (43.9)	17 (94.4)	<0.001*
≥2	26 (54.2)	3 (15)		24 (50)	0 (0)		16 (44.4)	9 (28.1)		23 (52.3)	1 (6.7)		23 (63.9)	8 (25.0)		23 (56.1)	1 (5.6)	
Estado de enfermedad																		
RC	34 (70.8)	12 (60)	0.27	35 (72.9)	7 (63.6)	0.39	28 (72.2)	20 (62.5)	0.27	29 (65.9)	11 (73.3)	0.55	26 (72.2)	20 (62.5)	0.27	29 (70.7)	13 (72.2)	0.58
no RC	14 (29.2)	8 (40)		13 (27.1)	4 (36.4)		10 (27.8)	12 (37.5)		15 (34.1)	4 (26.7)		10 (27.8)	12 (37.5)		12 (29.3)	5 (27.8)	
Ascondicionamiento																		
MA	33 (68.0)	13 (65)	0.48	32 (68.7)	9 (81.8)	0.27	24 (68.7)	22 (68.8)	0.53	29 (65.9)	12 (80)	0.24	23 (63.9)	23 (71.9)	0.33	28 (63.4)	15 (83.3)	0.1
NMA	15 (31.2)	7 (35)		16 (33.3)	2 (18.2)		12 (33.3)	10 (31.2)		15 (34.1)	3 (20)		13 (36.1)	9 (28.1)		15 (36.6)	3 (16.7)	
ATG en acondicionamiento																		
recibido	16 (33.3)	3 (15)	0.1	13 (27.1)	3 (27.3)	0.82	13 (36.1)	8 (10.0)	0.092	13 (29.5)	3 (20)	0.36	13 (36.1)	8 (10.0)	0.092	12 (29.3)	4 (22.2)	0.41
no recibido	32 (66.7)	17 (85)		35 (72.9)	8 (72.7)		23 (63.9)	26 (81.2)		31 (70.5)	12 (80)		23 (63.9)	26 (81.2)		29 (70.7)	14 (77.8)	
FLU en acondicionamiento																		
recibido	32 (66.7)	16 (80)	0.041*	34 (70.8)	10 (90.9)	0.16	21 (58.3)	29 (90.6)	0.002*	31 (70.5)	13 (86.7)	0.18	22 (61.1)	26 (81.2)	0.013*	28 (68.3)	16 (88.9)	0.005
no recibido	18 (33.3)	2 (10)		14 (29.2)	1 (9.1)		15 (41.7)	3 (9.4)		13 (29.5)	2 (13.3)		14 (36.9)	4 (12.5)		13 (31.7)	2 (11.1)	
Donante																		
hormano	27 (56.2)	16 (80)	0.064	30 (62.5)	8 (72.7)	0.39	20 (55.6)	23 (71.9)	0.12	26 (59.1)	12 (80)	0.12	20 (55.6)	23 (71.9)	0.12	25 (61.1)	13 (72.2)	0.3
no-relacionado	21 (43.8)	4 (20)		16 (37.5)	3 (27.3)		16 (44.4)	9 (28.1)		18 (40.9)	3 (20)		16 (44.4)	9 (28.1)		16 (39)	5 (27.8)	

Tabla 7. Análisis de la influencia de diferentes factores sobre la dinámica del quimioterapia en SP, LT y LA. Los resultados se muestran como el número de pacientes en OC/OM en el día +30 y día +60. El día +60 fue elegido en vez del +90 debido a que la mayoría de los pacientes adquirieron el OC en los primeros 2 meses tras el Ato-TPH. Los resultados al día +60 (n) se refieren a 59 pacientes, dado que 9 pacientes habían sido censurados con anterioridad (4 recaídas, 4 muertes y 1 fracaso de injerto).

7.5 Correlación entre la dinámica del quimerismo y el resultado del trasplante.

En la población de pacientes en riesgo, es decir aquella sin recaída o éxitus en el periodo de tiempo analizado, y por tanto en riesgo de desarrollar EICR aguda y/o crónica, se evidenció una incidencia de EICR aguda grado II-IV del 46,8% (30/64), mientras que la de EICR crónica fue de 67,3% (33/49), siendo de carácter leve en el 20,4% (10/49) y moderado/severo en el 46,9% (23/49) de los pacientes. El 41,2% (21/51) de los pacientes en riesgo recayeron, y la mortalidad fue del 47,1% (32/68), incluyendo aquellos con muerte relacionada con el trasplante (MRT, 29,4%, 20/68 durante todo el seguimiento) y los pacientes fallecieron como consecuencia de la recaída (17,6%, 12/68). Así, a los 2 años se observó una SLE del 70,5% (95% CI 63.5-77.5) y una SG del 71,9% (95% CI 66-77.8).

7.5.1 Desarrollo de EICR y quimerismo en Tregs

En cuanto al posible efecto de la dinámica del quimerismo en Tregs sobre el desarrollo de EICR, en el análisis de los 37 pacientes, la consecución del quimerismo completo en Tregs durante el seguimiento (n=37, días +30, +60 y +90) no mostró una asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de EICR aguda (grados II-IV ó grados III-IV), ni con la forma crónica (cualquier grado o extenso)(Tabla 8).

EICR aguda					EICR crónica			
	Quimerismo	N	G II-IV (%)	G III-IV (%)	N	Global (%)	Extenso (%)	
Día +30	QC	19	63,2	10,5	13	69,2	15,4	$p=1,000$
	QM	18	38,9	5,6	16	62,5	12,5	
Día +60	QC	27	55,6	11,1	22	68,2	18,2	$p=0,308$
	QM	7	42,9	0	7	57,1	0	
Día +90	QC	29	55,2	10,3	26	69,2	15,4	$p=0,267$
	QM	3	33,3	0	3	33,3	0	

Tabla 8. Porcentaje de pacientes con enfermedad injerto contra receptor (EICR) aguda (G II-IV: grado II-IV, G III-IV: grado III-IV) y crónica, en función del estado de quimerismo (QC o QM) en Tregs en los días +30, +60 y +90.

7.5.2 Desarrollo de EICR y quimerismo en LA

En el caso de los LA, al disponer de datos sobre la cohorte completa (n=68), se analizaron un mayor número de posibles factores que afectasen al desarrollo de la EICR aguda y crónica en dicha cohorte, los cuales se muestran en la Tabla 7. Aunque no se observó una asociación entre el desarrollo de EICR agudo y la consecución de QC en LT ($p=0.1$) o en SP (0.28) en el día +30, sí se observó una asociación estadísticamente significativa entre la consecución del QC en LA en el día +30 y el desarrollo de EICR aguda grado II-IV ($p=0.036$, HR=2.56, CI=1.1-6.1)(Tabla 9), factor que además fue el único que se mantuvo como estadísticamente significativo en el análisis multivariante tras la introducción de diferentes variables confusoras ($p=0.017$, HR=11.9 CI=1.56-91.7). El análisis de la incidencia acumulada de EICR grado II-IV en pacientes con QC o QM en SP, LT y LA mostró como los pacientes con QC en LA en el día +30 tuvieron una incidencia de EICR aguda grado II-IV significativamente mayor ($p=0.027$), mientras que este hecho no fue observado cuando se analizó el quimerismo en SP ($p=0.45$) o en LT ($p=0.22$; Figura 16).

		EICRa			EICRc		
		Grado ≤ I (n=32)¶	Grado II-IV (n=30)§	p	Leve (n=26)¶	moderado-severo (n=23)§	p
Edad paciente (años)		44	46	0.13	42	44	0.52
Diagnóstico	Linfoide	16 (50)	10 (33.3)	0.14	13 (50)	9 (39.1)	0.31
	Mieloide	16 (50)	20 (66.6)		13 (50)	14 (60.9)	
Diagnóstico	Aguda	21 (65.6)	16 (54.4)	0.23	16 (61.5)	12 (57.1)	0.35
	otro	11 (34.4)	14 (46.6)		10 (39.5)	11 (42.9)	
Líneas tratamiento previas	<2	17 (53.1)	19 (63.3)	0.28	17 (65.4)	12 (57.1)	0.25
	≥2	15 (46.8)	11 (36.7)		9 (34.6)	11 (42.9)	
Estado de enfermedad	RC	25 (78.2)	19 (63.3)	0.15	19 (73.1)	16 (69.5)	0.51
	no RC	7 (21.8)	11 (36.7)		7 (26.9)	7 (30.5)	
Donante	Hermano	19 (56.3)	19 (63.3)	0.47	18 (69.2)	13 (56.5)	0.26
	No-relacionado	13 (43.7)	11 (36.7)		8 (30.8)	10 (43.5)	
Género donante/receptor							
Donante mujer		14 (43.7)	9 (30)	0.19	11(42.3)	8 (34.8)	0.44
Acondicionamiento	MA	26 (81.2)	18 (60)	0.059	18 (69.2)	16 (69.5)	0.61
	NMA	6 (18.8)	12 (40)		8 (30.8)	7 (30.5)	
ATG en el acondicionamiento	Recibido	10 (31.3)	9 (30)	0.56	8 (30.8)	6 (26.1)	0.48
	No recibido	22 (68.7)	21 (70)		18 (69.2)	17 (73.9)	
FLU en acondicionamiento	Recibido	21 (65.6)	24 (80)	0.16	17 (65.4)	18 (78.3)	0.25
	No recibido	11 (34.4)	6 (20)		9 (34.6)	5 (21.7)	
Quimerismo día +30 SP	QC	21 (65.6)	23 (76.7)	0.25	17 (65.3)	20 (86.9)	0.077
	QM	11 (34.4)	7 (23.3)		9 (34.6)	3 (13.1)	
Quimerismo día +90 SP	QC				22 (84.6)	22 (95.6)	0.21
	QM				4 (15.4)	1 (4.4)	
Quimerismo día +30 LT	QC	14 (43.8)	19 (63.3)	0.098	14 (53.8)	13 (56.5)	0.54
	QM	18 (56.2)	11 (36.7)		12 (46.2)	10	
Quimerismo día +90 LT	QC				22 (84.6)	21 (91.3)	0.39
	QM				4 (15.4)	2 (8.7)	
Quimerismo día +30 LA	QC	13 (40.6)	20 (66.6)	0.036*	13 (50)	14 (60.9)	0.31
	QM	19 (59.4)	10 (34.4)		13 (50)	9 (39.1)	
Quimerismo día +90 LA	QC				20 (76.9)	23 (100)	0.016*
	QM				3 (23.1)	0	
EICRa							
Grado II-IV					8 (30.7)	14 (60.9)	0.033*
≤ Grado I					18 (69.3)	9 (39.1)	

Tabla 9. Análisis de la influencia de diferentes factores en el desarrollo de enfermedad injerto contra huésped aguda grado II-IV y crónica moderada-severa. La fuente de progenitores hematopoyéticos (MO vs SP) no pudo ser analizada y comparada debido al escaso número de pacientes en los que se utilizó MO (n=5). Los resultados se refieren a n=32 pacientes (¶) en el grupo con EICRa grado ≤ I y a n=30 pacientes (§) en el grupo de EICRa grado II-IV, dado que 6 pacientes habían sido censurados previamente (4 recaídas, 1 muerte y 1 fracaso de injerto). Los resultados se refieren a n=26 pacientes (¶) en el grupo con EICRc leve y a n=23 pacientes (§) en el grupo de EICRc moderado-severo, dado que 19 pacientes fueron censurados antes de producirse dicho evento (9 recaídas, 8 muertes, 1 rechazo de injerto 1 ILD) DLI).

En el análisis univariante, el único de los factores que afectó al desarrollo de EICR crónica moderada-severa fue el desarrollo de EICR aguda grado II-IV previa ($p=0.017$). Mientras que la consecución de QC en LA en el día +90 mostró una tendencia a asociación no estadísticamente significativa ($p=0.17$, HR: 26.4, CI=0.22-3053), no se observaron diferencias en cuanto a la consecución de QC en SP y LT y el desarrollo de EICR crónica moderada-severa. En términos de incidencia acumulada, los pacientes con QC en LA en el día +90 tuvieron una mayor proporción de EICR crónico moderado-severo, con diferencias estadísticamente significativas ($p<0.001$), mientras que no hubo esta significación estadística cuando se analizó el QC en el día +90 en SP ($p=0.336$) o LT ($p=0.549$; Figura 16). El análisis multivariante no pudo realizarse ya que únicamente se observaron 9 pacientes en QM en el día +90.

En este estudio, pese a diferencias en la incidencia de EICR, éstas no se tradujeron en diferencias en tasas de recaída o supervivencia global (independientemente de la causa) en pacientes con diferentes dinámicas de quimerismo en SP, LT y LA.

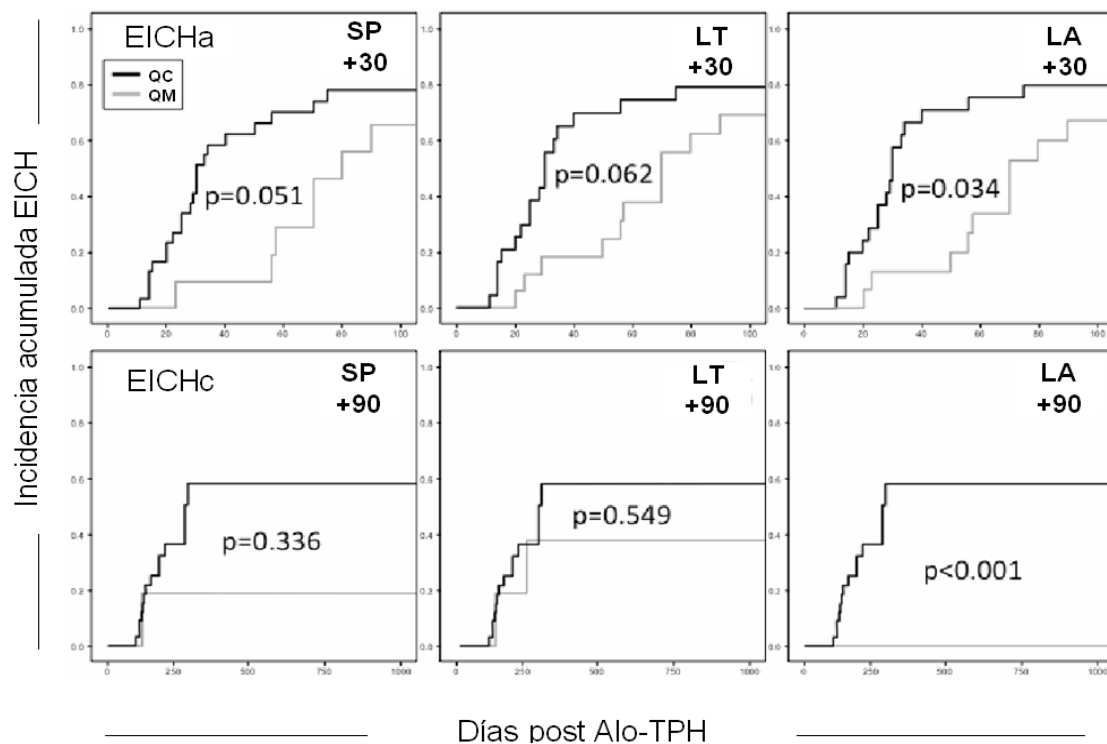


Figura 16. Asociación del quimerismo en SP, LT y LA con la incidencia de EICR. El panel superior muestra la incidencia acumulada de EICRa en pacientes con QC (línea negra) o QM (línea gris) en el día +30 en SP, LT y LA. Los paneles inferiores muestran la incidencia acumulada de EICRc en el día +90 en pacientes con QC (línea negra) o QM (línea gris) en el día +90 en SP, LT y LA.

7.6 Supervivencia y quimerismo en Tregs

Se analizó la posible influencia de la consecución del QC en Tregs en los diferentes momentos del trasplante (día +30, +60 y +90) en la supervivencia global (SG), supervivencia libre de evento (SLE) y la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT), no revelándose diferencias en SG, SLE y MRT. Sin embargo, y como dato destacable, sí se observó que en el día + 60 y +90, ninguno de los 7 pacientes que se mantuvieron en QM en Tregs falleció consecuencia del trasplante (MRT), sin observarse tampoco ninguna recaída (Figura 17).

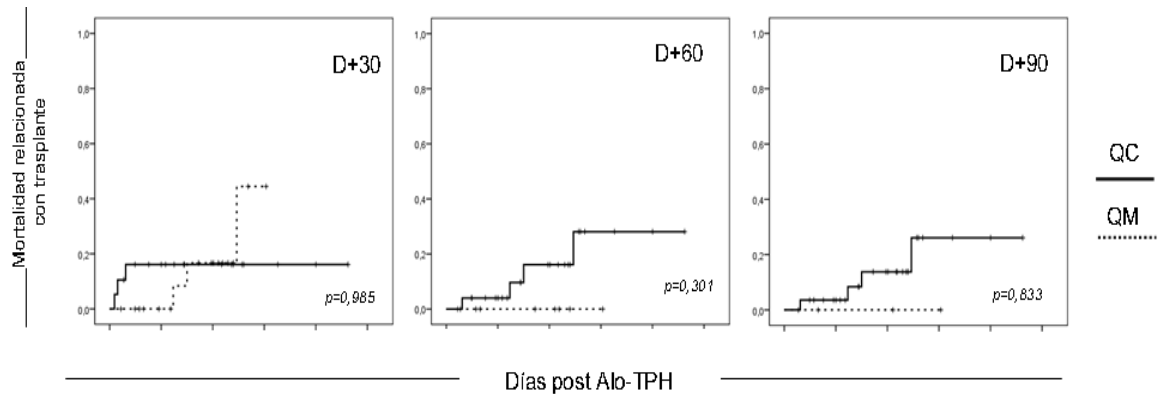


Figura 17. Supervivencia global (SG), supervivencia libre de evento (SLE) y mortalidad relacionada con el trasplante (MRT), en función de la consecución de QC en Tregs en los diferentes momentos del trasplante (día +30, +60 y +90).

7.7 Supervivencia y quimerismo en LA

Se analizó la posible influencia de la consecución del QC en LA en los diferentes momentos del trasplante (día +30, +60 y +90) en la supervivencia global (SG), supervivencia libre de evento (SLE) y la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT), no observándose ninguna diferencia estadísticamente significativa.

7.8 Análisis comparativo del quimerismo en LT y LA

La dinámica del quimerismo fue similar en LT y LA en 51 de los 68 pacientes con estudio del quimerismo en LA, incluyendo 7 pacientes que no adquirieron QC y que fueron censurados en QM en ambos linajes leucocitarios, así como 44 pacientes que adquirieron el QC al mismo tiempo en el post Alo-TPH.

Por otro lado, 17/68 pacientes alcanzaron el QC en diferentes momentos durante su seguimiento en el post trasplante (Tabla 10, Figura 18), incluyendo 16 pacientes que alcanzaron el QC en ambos LT y LA, así como 1 paciente que alcanzó el QC en LA en el día +90, y que fue censurado por recaída en el día +334 permaneciendo en QM en LT (Paciente 16 en Tabla 10, Figura 18).

Grupo	Pac	Diag.	Estado enfermedad	Donante	Fuente PH	Acondic.	Día EICHa	EICHc	Recaída (día)	Exitus (día)	FUS (día)
1	1	LNH	3RC	DE HLA-id	SP	NMA		sí			+1186
	2	LAL	2RC	DE HLA-id	SP	MA	(*)	(*)	+41	+457	+457
	3	LAL	2RC	DE HLA-id	SP	MA		sí			+884
	4	LAL	1RC	DE HLA-id	SP	MA			+541	+996	+996
	5	LAL	1RC	DE HLA-id	SP	MA				+457	+457
	6	LAM	2RC, EMR+	DNE	MO	MA					+809
	7	MM	VGPR	DE HLA-id	SP	NMA			+188		+881
	8	LAM	1RC, EMR+	DE HLA-id	SP	MA		sí			+853
	9	LAM	1RC	DNE	SP	NMA	grado II, +20	sí		+548	+548
	10	LAL	1RC, EMR+	DE HLA-id	SP	MA			+215	+1151	+1151
	11	SMD	1RC, EMR+	DE HLA-id	SP	MA			+244	+702	+702
	12	LLC	RP	DNE	SP	MA		sí			+661
2	13	SMD	1RC	DNE	SP	MA	grado III +28				+1688
	14	LAL	2RC, EMR+	DE HLA-id	SP	MA	grado II +21	(*)		+113	+113
	15	LAM	1RC	DE HLA-id	SP	NMA	grado II +29	sí			+1180
	16	LAM	1RC	DE HLA-id	SP	MA	grado II +75	sí	+334	+913	+913
	17	LAM	1RC	DE HLA-id	SP	MA	grado II +80	sí			+1142

Tabla 10. Características de pacientes y trasplantes así como su evolución tras el Alo-TPH, en pacientes que adquirieron el QC en LA y LT en diferentes momentos durante el seguimiento. (*) censurado por recaída o éxitus.

Este grupo de 17 pacientes fue a su vez dividido en 2 subgrupos en función del linaje leucocitario que había alcanzado primero el QC, ya fuese LT o LA (Tabla 10, Figura 18). Los pacientes asignados al Grupo 1 (12/17; 70,6%; Pacientes 1-12 in Figura 18) alcanzaron el QC en LT más pronto (media 52,7 días; rango 15-180) que en LA (media 75,7 días; rango 30-210), con una diferencia de 23 días (rango 15-70). Por otro lado, los pacientes asignados al Grupo 2 (5/17; 29,4%; pacientes 13-17 en Figura 18) alcanzaron el QC en LA más temprano (media 47,8 días; rango 15-90) que en LT (media 65,3 días; rango 21-120), con una diferencia media de 28 días (rango 7-60).

Sí se observó una asociación entre la consecución del QC en LA y el desarrollo de EICR agudo grado II-IV. Así, la incidencia de EICR agudo grado II-IV en el Grupo 1 (QC en LT temprano y tardío en LA) fue del 9,1% (1/11), mientras que en el Grupo 2 (QC temprano en LA y tardío en LT) fue del 100% (5/5; $p=0,001$; Tabla 11, Figura 18). Más aún, pacientes del Grupo 2 desarrollaron EICR agudo grado II-IV tras la consecución del QC en LA, aún manteniéndose en QM en LT (Figura 18).

La incidencia de EICR crónico moderado-severo fue menor en el Grupo 1 (36,4%, 4/11 en pacientes en riesgo), que en el Grupo 2 (75%, 3/4 pacientes en riesgo), aunque dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,23$). No se observaron diferencias entre ambos grupos en términos de recaída (33,3%, 4/12 en el Grupo 1 vs. 20%, 1/5 en el Grupo 2 ($p=0,39$)), MRT (33,3%, 4/12 en el Grupo 1 vs. 40%, 2/5 en el Grupo 2 ($p=0,39$)) o muerte por progresión de la enfermedad (8,3%, 1/12 en el Grupo 1 vs. 0%, 0/5 en el Grupo 2 ($p=0,56$)).

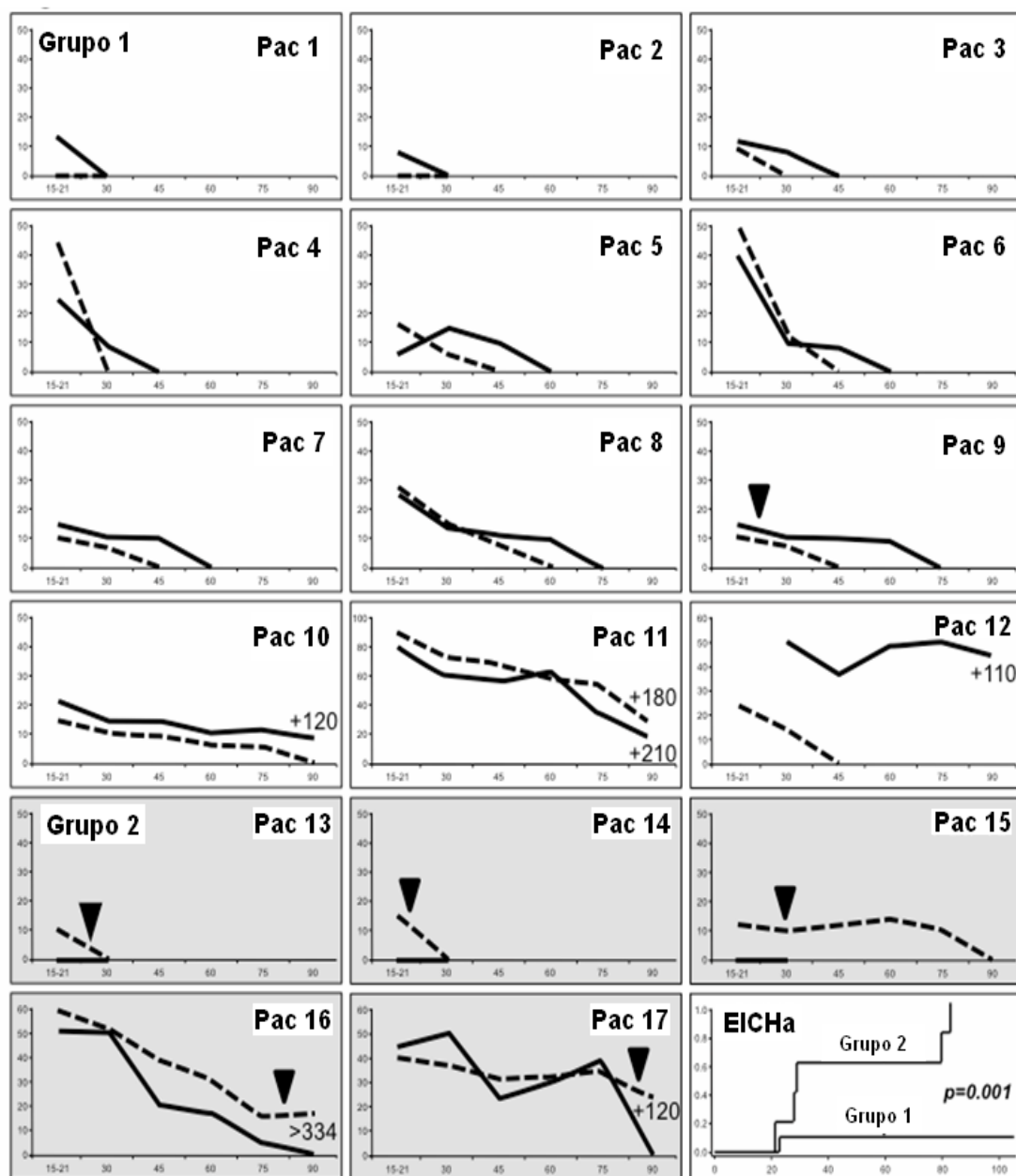


Figura 18. Dinámica del quimerismo durante los primeros 3 meses post Alo-TPH en pacientes que alcanzaron el QC en LT y LA en diferentes momentos durante el seguimiento. Grupo 1 pacientes 1-12; Grupo 2 pacientes 13-17. El día de consecución de QC se muestra en los pacientes que adquirieron QC más allá del día +90 (Pac. 10, 11, 12, 16, 17). El paciente número 16 se censuró debido a recaída en el día +334 cuando permanecía en QM en LT.

El análisis comparativo de las curvas de SG, SLE y MRT, entre los grupos con QC en LT y LA en la misma determinación, o en momentos diferentes (QC en LA tardío o temprano) no mostró diferencias significativas.

7.9 Análisis comparativo del quimerismo en LT y Tregs.

De los 37 pacientes en los que se pudo analizar el quimerismo en Tregs, 26 (71%) adquirieron QC al mismo tiempo en LT y Tregs. De éstos, el 53,8% (14/26) desarrollaron EICR aguda grado II-IV, y 3 pacientes grado III-IV. La incidencia de EICR crónica fue de 53,8% (14/26). En el seguimiento de estos 26 pacientes, la tasa de recaída fue del 46,1% (12/26), con una mediana de SLE y SG de 390 días y 876 días respectivamente.

Por otro lado, la dinámica de consecución de QC en Tregs y LT fue diferente en 11 (29%) de los pacientes estudiados.

Nueve de estos 11 pacientes (Tabla 11) adquirieron el QC en LT mientras persistía la situación de QM en Tregs (QC LT – QM Tregs)(Figura 19). Tres 3 de ellos (3/9, 33,3%) desarrollaron EICR aguda grado II-IV, y sólo uno de ellos alcanzó un EICR aguda grado III-IV. Además, en el seguimiento de estos 9 pacientes, sólo se evidenció una recaída en un paciente, en el día +240 post Alo-TPH, el cual falleció en el día +540 por progresión de su enfermedad. En el análisis de SLE y SG, este grupo de 9 pacientes no había alcanzado la mediana en el momento de realizar el estudio.

Los otros 2 pacientes adquirieron el QC en Tregs mientras persistía QM en LT (QC Tregs – QM LT)(Figura 19). Ambos pacientes desarrollaron EICR agudo grado III, falleciendo uno de ellos por un Síndrome Linfoproliferativo post Alo-TPH (PTLD) en el día +111, y observándose una recaída en el otro en el día + 300, paciente que falleció por progresión de su enfermedad en el día +315 (Figura 19). Al tratarse de 2 pacientes no se llevaron a cabo curvas de supervivencia.

Grupo	Pac	Diag.	Estado enf.	Donante	Fuente PH	Acondic.	Día EICHa	EICHe	Recaída (día)	Exitus (día)	FUS (día)
QC LT – QM Tregs	1	EH	RP	DE HLA-id	MO	NMA					+735
	2	LAL	1RC	DNE HLA-id	SP	MA					+949
	3	LAM	RC	DNE HLA-id	SP	MA	grado II, +37	si			+769
	4	LAM	RP	DE HLA-id	MO	MA					+432
	5	LAM	RC	DNE HLA-id	SP	NMA	grado II, +80				+264
	6	LAM	RC	DE HLA-id	SP	MA					+1108
	7	LAL	2RC	DE HLA-id	SP	MA	grado II, +90				+528
	8	LAM	RC	DNE HLA-id	SP	NMA		si			+548
	9	LAM	RC	DE HLA-id	SP	MA		si	+240	+350	+350
QC Tregs – QM LT	1	SMD	1RC	DE HLA-id	SP	MA	grado III, +85		+300	+315	+315
	2	LAM	1RC	DNE	SP	MA	grado III, +65	(*)		+111	+111

Tabla 11. Características de pacientes y trasplantes así como su evolución tras el Alo-TPH, en pacientes que adquirieron el QC en Tregs y LT en diferentes momentos durante el seguimiento.

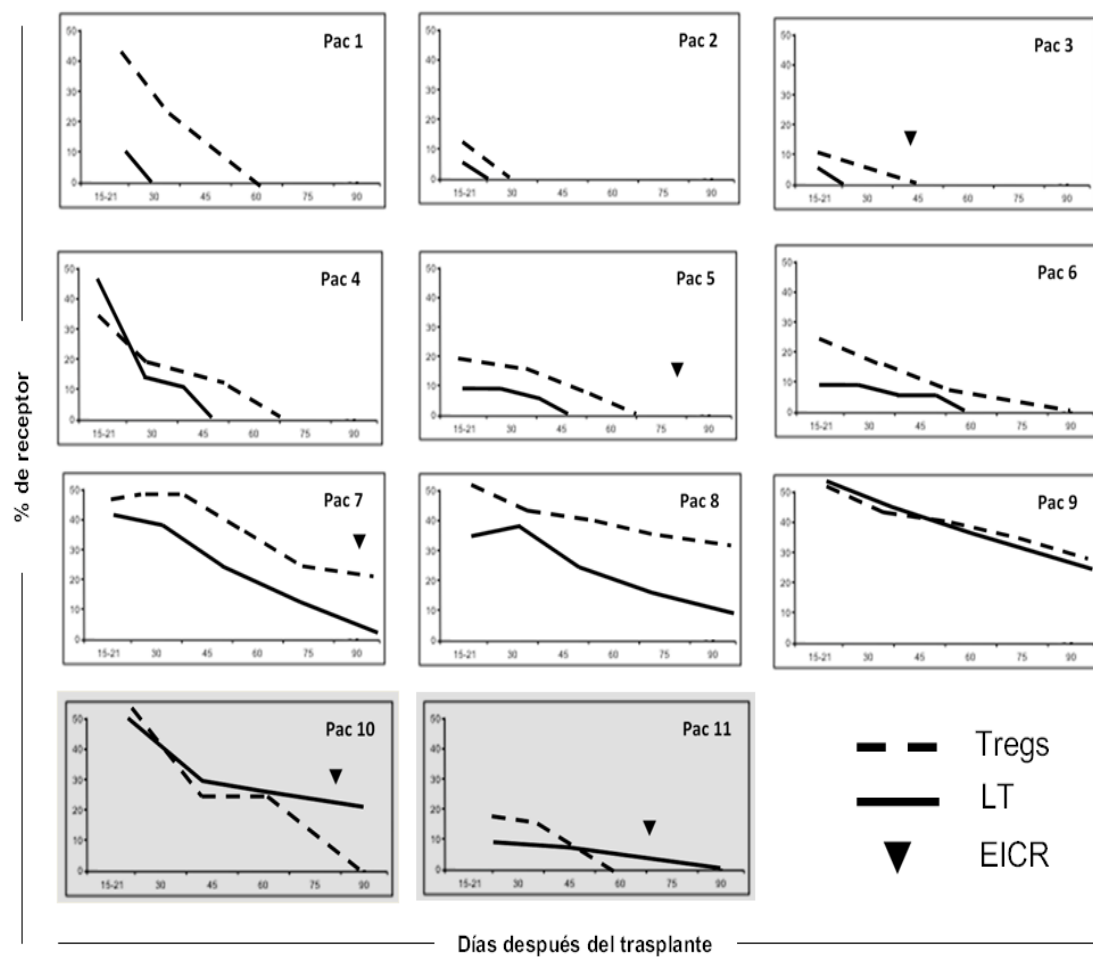


Figura 19. Representación de la dinámica del quimerismo en SP, LT y Tregs de los pacientes con consecución de QC en Tregs y LT en diferentes momentos (n=11). Pacientes 1-9, QC LT – QM Tregs; pacientes 10-11, QC Tregs – QM LT.

Se realizó un análisis comparativo de las curvas SG, SLE y MRT entre el grupo de pacientes con QC en LT y Tregs en la misma determinación (n=26) y el grupo con QC tardío en Tregs (QC LT- QM Tregs, n=9). Dicho análisis mostró una mejor SLE, con significación estadística, a favor del grupo con QC tardío en Tregs ($p=0,037$)(Figura 20). También se observó una mejor SG, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,319$)(Figura 20). No se observaron diferencias en la MRT ($p=0,607$) entre los dos grupos, ni tampoco en la incidencia de EICR aguda grado II-IV ($p=0,311$), EICR aguda grado III-IV ($p=0,590$), EICR crónica global ($p=0,550$) o EICR extensa ($p=0,311$). Los dos pacientes con QC temprano en Tregs (QC Tregs- QM LT n=2) no fueron incluidos en este análisis estadístico.

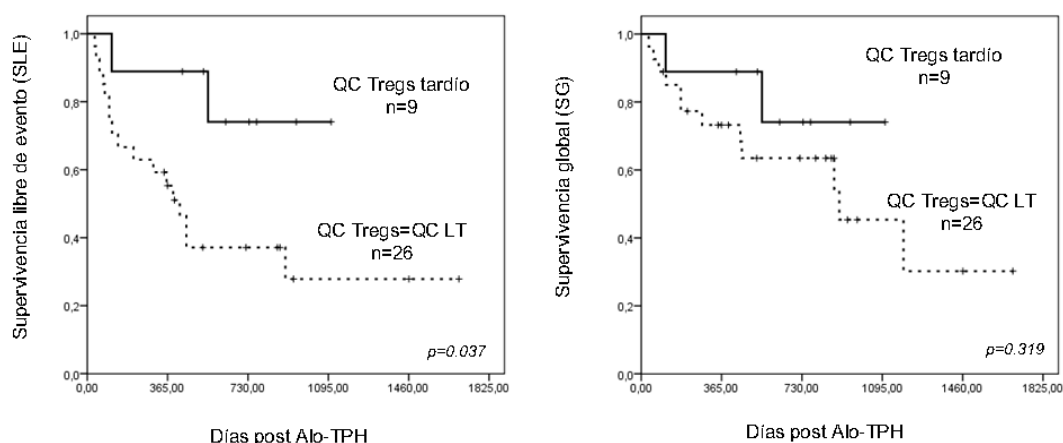


Figura 20. Curvas comparativas de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de evento (SLE) entre los grupos con QC en LT y Tregs en la misma determinación (n=26) y el grupo con QC tardío en Tregs (n QC LT- QM Tregs, n=9)

7.10 Análisis del quimerismo en Tregs y LA.

Veintisiete de los 37 pacientes en los que se analizó en quimerismo en Tregs adquirieron el QC en Tregs LA y en la misma determinación post Alo-TPH. En éstos la incidencia de EICR aguda grado II-IV fue del 59,2% (16/27), con 14,8% EICR aguda grado III-IV (4/27). La incidencia de EICR crónica fue del 62,9 % (17/27). En el seguimiento de estos 27 pacientes, la tasa de recaída fue del 40,7% (11/27), con una mediana de SLE y SG de 420 y 876 días respectivamente.

Los 10 pacientes restantes adquirieron el QC en Tregs y LA en distintos momentos post Alo-TPH (Tabla 12).

En 8 de estos 10 pacientes el QC en Tregs tuvo lugar de manera más tardía que en LA (QC LA- QM Tregs)(Figura 13). La incidencia de EICR aguda grado II-IV fue del 50% (4/8), aunque ninguno desarrolló EICR aguda grado III-IV. La incidencia de EICR crónica fue del 37,5% (3/8). En el seguimiento de estos 8 pacientes, ninguno recayó de su enfermedad. Sólo falleció 1 por sepsis bacteriémica.

Los 2 pacientes restantes, adquirieron el QC en Tregs antes que en LA (QC Tregs – QM LA)(Figura 21). Ninguno de ellos desarrolló EICR ni aguda ni crónica y ambos recayeron en el día +210 y +40.

Grupo	Pac	Diag.	Estado enf.	Donante	Fuente PH	Acondic.	Día EICHa	EICHe	Recaída (día)	Exitus (día)	FUS (día)
QC LA – QM Tregs	1	LAM	RC	DE HLA-id	SP	MA					+629
	2	LAM	RC	DNE HLA-id	SP	NMA	grado II, +85	si		+548	+548
	3	SMD	RP	DE HLA-id	SP	MA			+240	+350	+350
	4	EH	RP	DE HLA-id	SP	NMA					+735
	5	LAM	RP	DNE HLA-id	MO	MA					+432
	6	LAL	RC	DE HLA-id	SP	MA	grado II, +55				+113
	7	LAM	RC	DNE HLA-id	SP	MA					+365
	8	EH	RP	DE HLA-id	SP	NMA	grado II, +65				+937
QC LA – QM Tregs	1	LAL	RC	DE HLA-id	SP	MA			+40	+540	+540
	2	LAL	RC	DNE HLA-id	SP	MA			+210	+210	+210

Tabla 12. Características de pacientes y trasplantes así como su evolución tras el Ato-TPH, en pacientes que adquirieron el QC en Tregs y LA en diferentes momentos durante el seguimiento. QC LA- QM Tregs, n=8. QC Tregs - QM LA, n=2.

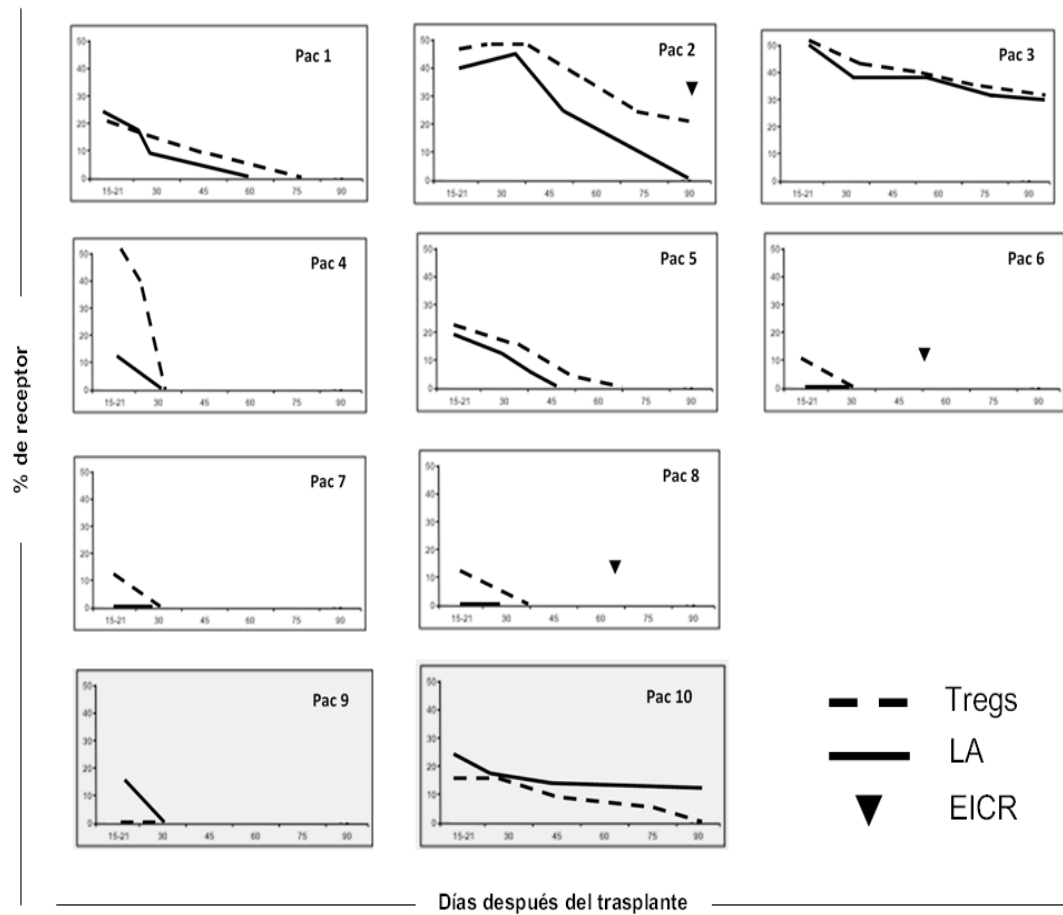


Figura 21. Representación de la dinámica del quimerismo en Tregs LA de los 10 pacientes con consecución de QC en diferentes momentos en Tregs y LA. Pacientes 1-8, QC LA- QM Tregs; pacientes 9-10, QC Tregs- QM LA).

Se realizó un análisis comparativo de las curvas SG, SLE y MRT entre el grupo de pacientes con QC en Tregs y LA y en la misma determinación (n=27) y el grupo con QC tardío en Tregs (QC LA- QM Tregs, n=8). Dicho análisis mostró una mejor SLE, con significación estadística, a favor del con QC tardío en Tregs ($p=0,019$)(Figura 22). También se observó una tendencia a una mejor SG, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0,067$)(Figura 22). No se observaron diferencias en la MRT ($p=0.326$), ni tampoco en la incidencia de EICR aguda grado 2-4 ($p=0.506$), EICR agudo grado 3-4 ($p=0.434$), EICR crónico global ($p=0.09$) o EICR extenso ($p=0.276$). Los dos pacientes con QC temprano en Tregs (QC Tregs- QM LA, n=2) no fueron incluidos en este análisis estadístico.

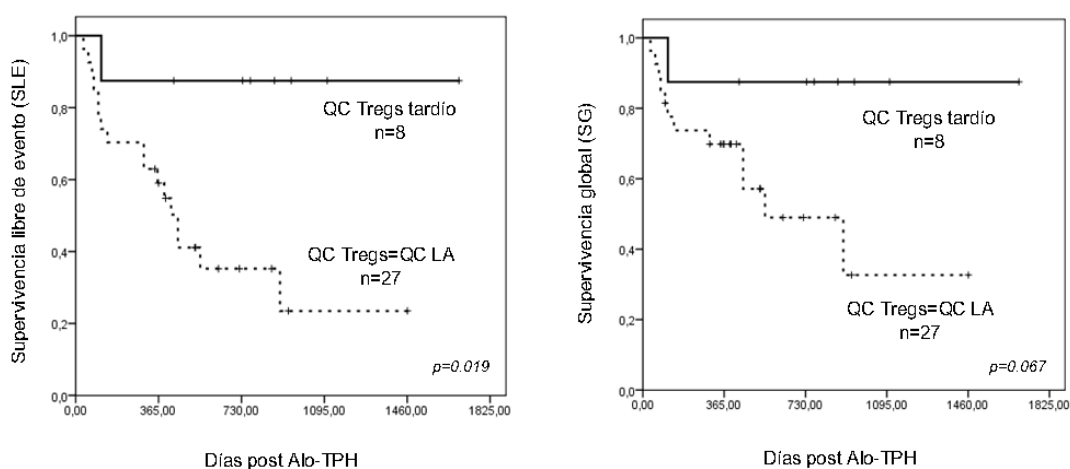


Figura 22. Curvas comparativas de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de evento (SLE) entre los grupos con QC en LA y Tregs en la misma determinación (n=27) y el grupo con QC tardío en Tregs (n=8)

8. Discusión.

El Alo-TPH es en la actualidad la única opción curativa para muchos pacientes con enfermedades hematológicas neoplásicas y no neoplásicas (1). Tras el descubrimiento, en los años 50 del siglo XX, que el tejido hematopoyético de un paciente puede ser sustituido por otro genéticamente distinto, sin provocar la muerte del primero, se han producido grandes avances científicos en el campo del Alo-TPH. Este hecho se ha traducido en una mejoría de los resultados globales, tanto en términos de supervivencia global (SG) y supervivencia sin recaída (SLE), como en calidad de vida de los pacientes al disminuir la incidencia y severidad de las complicaciones, principalmente por: el mejor manejo de las infecciones, la mejora en la política transfusional, el desarrollo de métodos de tipaje HLA de alta resolución para una mejor selección de donantes, el uso de factores estimulantes de colonias granulocíticas que favorecen la recuperación hematopoyética, los regímenes de acondicionamiento como los de intensidad reducida (o no mieloablativos), la diversificación de fuentes de progenitores hematopoyéticos como la médula ósea o sangre periférica movilizada, el uso de donantes alternativos (sangre de cordón umbilical o donante haploide), las terapias inmunosupresoras, etc.

Sin embargo, las tasas globales de supervivencia a largo plazo se estiman solo en un 40-50%, con tasas de recaída del 30%, y una MRT alrededor del 20-30% (1). En este contexto, la calidad de vida de los pacientes trasplantados sigue viéndose afectada por la EICR, que continúa siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad tras el Alo-TPH (15,94–96). Ésta es una neoenfermedad, producida por las células inmunocompetentes del donante (19,20). Los avances en el conocimiento de la biología del Alo-TPH han permitido desentrañar su fisiopatología, en la que las células del donante (principalmente linfocitos T) una vez infundidas, con el injerto, y mediante diferentes mecanismos de reconocimiento y contacto celulares, se activan, proliferan, migran y llevan a cabo una actividad citotóxica sobre células del receptor (19–25,27), con el consiguiente daño tisular, fundamentalmente en el hígado, si el daño es a los

hepatocitos, en la piel o en la mucosa gastrointestinal, como las dianas mas frecuentes (17). La EICR se puede clasificar en aguda y crónica, atendiendo al momento en el que tiene lugar (antes o después del día +100). El grado de afectación varia de uno a otro paciente y de un órgano diana a otro, dando lugar a clasificaciones, según el grado de intensidad de afectación y la extensión de órganos afectados, tanto para la forma aguda como la crónica (19). Globalmente puede llegar a afectar a un 40% de los Alo-TPH de donante familiar idéntico, y hasta el 70% de los Alo-TPH de donante no emparentado, constituyendo la principal causa de MRT más allá del día +100 (15,19,22,96).

Los principales factores que afectan al desarrollo de la EICR son las disparidad HLA entre donante y receptor, el uso de la sangre periférica como fuente de progenitores hematopoyéticos, el uso de donantes no emparentados o el uso de radioterapia en el acondicionamiento pre Alo-TPH, entre otros (17). Se ha demostrado además, que el desarrollo de la forma aguda es el principal factor predispone para el desarrollo de EICR crónica (17,25).

Sin embargo, y pese a los efectos adversos de este fenómeno aloimmune, la EICR está relacionada con el efecto injerto contra leucemia (EICL, graft versus leukemia), en el que los linfocitos activados provenientes del donante, además de “atacar” a células normales del receptor, desencadenan una respuesta inmune sobre las propias células tumorales, ayudando así a erradicar la posible enfermedad residual y por tanto disminuyendo las tasas de recaída post Alo-TPH (30–34). Más aún, se ha demostrado que las infusiones de linfocitos provenientes del donante tras el Alo-TPH, favorecen la erradicación de la enfermedad residual y disminuyen las tasas de recaída en el Alo-TPH (36–39). Así, se puede considerar que el objetivo principal a conseguir del Alo-TPH es conseguir el máximo efecto antitumoral aprovechando su efecto inmunológico contra el tumor (EICL), evitando la aparición de EICR

El estudio del balance de fuerzas inmunes, es decir de “alotolerancia” y “alorreactividad” entre donante y receptor es una de las principales áreas de investigación actual en el Alo-TPH (20,39). En el ámbito de este campo de estudio, la evaluación periódica de la proporción entre la celularidad procedente del receptor y del donante tras la infusión del injerto, objetivo del denominado análisis del quimerismo hematopoyético, aporta una información relevante para el seguimiento post Alo-TPH (42–46). Estos estudios intentan establecer una asociación entre la dinámica del desarrollo del quimerismo hematopoyético en SP, MO o distintos linajes celulares con la aparición de diferentes eventos clínico-biológicos en el curso del post Alo-TPH (42–44,46). En este sentido, aparentemente los estudios de quimerismo son de particular utilidad cuando se realizan sobre diferentes linajes celulares con presumibles roles diferenciados en el desarrollo de complicaciones post Alo-TPH (57,58,60,63,64,97).

El análisis del quimerismo en los linfocitos T (LT, CD3+) ha demostrado su utilidad clínica para predecir el desarrollo de rechazo (98,99) y en menor medida de recaída de la enfermedad, y se ha asociado con la aparición de la EICR post Alo-TPH, (56–58). Así, un QC temprano se asocia a un mejor prendimiento del injerto hematopoyético del donante, aumento del riesgo de desarrollar EICR, pero también con un menor riesgo de recaída. Por el contrario el QM se asocia a un mayor riesgo de rechazo y de recaída y menor riesgo de EICR (98,100). Sin embargo, en la práctica diaria, la interpretación biológica y la utilidad clínica del análisis del quimerismo en linfocitos T (LT, CD3+ purificados), puede estar artefactada por la inclusión en este linaje leucocitario tanto de LT alorreactivos como de LT naive/anérgicos.

Es en este contexto donde surge la idea de analizar la dinámica del quimerismo en otros subgrupos celulares, y su posible a posible influencia en el desarrollo de complicaciones tras el Alo-TPH.

8.1 Dinámica del quimerismo en Linfocitos Tregs (CD4+/CD25+)

Es bien conocido que los linfocitos Tregs, una vez infundidos con el injerto, sufren un proceso de selección y expansión tímica y periférica (78,79), ocupando parte del nicho linfohematopoyético en el receptor (87). Adquieren así su capacidad efectora, que en el contexto del Alo-TPH se basa en modular la respuesta inmune, facilitando la alotolerancia entre donante y receptor y evitando la alorreactividad mediada por células procedentes del donante. Adicionalmente, son cruciales para el desarrollo del sistema inmune, por lo que su adecuada proliferación y maduración, en el receptor está asociada con un desarrollo inmunológico exitoso post Alo-TPH (81,82).

Dadas estas funciones, una mayor proporción de Tregs activos favorece, por un lado, el injerto hematopoyético del donante, evita el rechazo y se asocia a una menor tasa de EICR (84,101) y por tanto de las complicaciones derivadas de la misma (MRT), pero a su vez, por otro lado, facilita el efecto injerto-contraleucemia (EICL) (82). Por todo ello, existen en la actualidad varias líneas de investigación que pretenden expandir esta población de Tregs, ya sea *ex-vivo* para posterior infusión en el paciente (84), o *in-vivo* mediante la utilización de diferentes fármacos que aumenten la proliferación de este subgrupo celular como la 5-Azacitidina o la rapamicina (85,86).

Por otro lado, hay estudios publicados que demuestran la persistencia de Tregs del receptor en el Alo-TPH, incluso tras acondicionamientos mieloablativos de quimio/radioterapia (87). Sin embargo, se desconoce la funcionalidad de los mismos, y por tanto en el periodo precoz post Alo-TPH qué papel juegan los Tregs del donante o del receptor en esta actividad reguladora. Esto hace más interesante investigar cómo es la dinámica del quimerismo en esta subpoblación celular.

El presente estudio de análisis del quimerismo en Tregs comprobó primero, mediante un estudio piloto que incluyó a 8 pacientes sometidos a Alo-TPH, la factibilidad del análisis del quimerismo tras la purificación inmunomagnética de linfocitos CD4+/CD25+ Tregs, en el seno del Alo-TPH. A pesar de la exigua

representación de este subgrupo celular en el periodo precoz post Alo-TPH, se obtuvieron muestras con una pureza >95% por citometría de flujo (Figura 10), permitiendo además obtener ADN suficiente para la realización de la PCR y posterior análisis del quimerismo por STR. Con los resultados obtenidos, y de acuerdo con publicaciones previas (87) se corroboró, mediante dicho estudio piloto, la persistencia de Tregs provenientes del receptor en el post Alo-TPH, que la dinámica del quimerismo en este linaje es distinta a la de la SP, LT y LA en un porcentaje de pacientes no desdeñable (Tabla 4), y que esta dinámica no se veía influenciada por el tipo de acondicionamiento del Alo-TPH (MA ó NMA).

Una vez realizado el estudio de factibilidad, se continuó con el análisis del quimerismo en Tregs sobre la cohorte completa. Como ya se mencionó previamente, de los 68 pacientes incluidos en el estudio completo, y debido al elevado volumen de sangre requerido para el análisis del quimerismo en linajes leucocitarios, sólo se pudo realizar el análisis del quimerismo de manera conjunta en Tregs, LT y LA en 37 pacientes.

Así, sobre esta cohorte de 37 pacientes, se observó primero que la consecución del QC en Tregs tenía lugar de manera más tardía que en SP, LT y LA, con un tiempo medio para alcanzar el QC en Tregs de 51,2 días, mientras que fue de 36,8 días para la SP, 46,7 días para LT y 47,0 para LA, diferencias que además fueron estadísticamente significativas en el análisis comparativo ($p<0.05$)(Figura 12).

En cuanto al porcentaje de pacientes en QC en Tregs, en los diferentes momentos post Alo-TPH, se observó un menor porcentaje de pacientes en QC en Tregs en el periodo inicial tras el Alo-TPH. Este hecho fue más llamativo en el periodo más precoz (día +30), en el que el 51,4% de los pacientes estaban en QC en Tregs mientras que este porcentaje fue del 75,7% en SP, 64% en LT y 56,8% en LA. En el día +60, aunque se observaron diferencias, éstas perdieron la significación estadística, y en el día +90 no se observaron diferencias.

Estos resultados son consistentes con las publicaciones previas (87) que demostraron la persistencia de Tregs tras altas dosis de QT/RT, hecho que favorece una dinámica de quimerismo en Tregs distinta a los LT, mantenido un QM más prolongado tras el Alo-TPH.

Analizando los posibles factores que afectaban la consecución del QC en Tregs se observó que los pacientes con enfermedades linfoides y los pacientes que no recibieron fludarabina como parte del acondicionamiento tuvieron una mayor probabilidad de alcanzar el QC en Tregs en el día +30 pero no en el +60 (Tabla 6). La fludarabina, ampliamente utilizada en el Alo-TPH, es conocida por su actividad anti-linfocito T. Su uso como parte del acondicionamiento previo al Alo-TPH podría disminuir la cantidad de Tregs del paciente, hecho ya descrito previamente (102) facilitando así la ocupación del nicho hematopoyético por Tregs del donante de manera más precoz en el periodo post Alo-TPH, y así facilitando la consecución del QC en dicho linaje. A diferencia de la dinámica de consecución de QC en LA, LT y SP, la consecución de QC en Tregs no se vio influenciada por el número líneas de tratamiento previo al Alo-TPH.

También se observaron diferencias en el análisis cuantitativo de la proporción media de celularidad del receptor en los diferentes linajes, observándose que el porcentaje medio de receptor en Tregs fue mayor en los primeros 60 días post Alo-TPH (Figura 6). Así, en el día +30 el porcentaje medio de receptor en Tregs fue del 18% mientras que en SP fue del 1.27% ($p < 0.05$), diferencias que se mantuvieron en el día +60 (Tregs 7.7% vs SP 1.0 %; $p < 0.05$). Estas diferencias además se mantuvieron cuando se analizaron los pacientes en función del acondicionamiento realizado, no mostrando diferencias con respecto a la cohorte general.

Podemos así concluir, que la dinámica del quimerismo en Tregs post Alo-TPH es diferente a la de los LT en una proporción de pacientes, hecho no reportado hasta la fecha, observándose una mayor proporción de Tregs del receptor en comparación

con los LT y otros linajes leucocitarios, y por tanto, una consecución del QC más tardía. Así como diferentes métodos (*in-vivo* y *ex-vivo*) (84–86) son capaces de expandir la población de Tregs post Alo-TPH, desconocemos por ahora si esta población de Tregs “expandida” tiene su origen en la hematopoyesis del donante, o si por el contrario proviene de la hematopoyesis residual del receptor. En este sentido, la utilización de determinadas drogas en el acondicionamiento ó en el periodo previo al Alo-TPH, podría aumentar el repertorio de Tregs del receptor de manera natural, y por tanto aumentar la cantidad de Tregs en el periodo precoz tras el Alo-TPH, favoreciendo los efectos inmunológicos de dicha población leucocitaria.

8.1.1 Influencia de la dinámica del quimerismo en Tregs en el desarrollo de complicaciones post Alo-TPH

Una vez demostrada la persistencia de Tregs del receptor post Alo-TPH, y demostrada también que la dinámica del quimerismo en Tregs no sigue la misma dinámica que la SP o LT, se realizó un análisis retrospectivo para evaluar la relación del quimerismo en Tregs y el desarrollo de EICR, la supervivencia global y la recaída en la cohorte de los 37 pacientes mencionados.

De acuerdo con una de las hipótesis planteadas, el QM en Tregs estaría asociado a una menor incidencia de EICR, ya que la persistencia de Tregs activos del receptor favorecería su efecto inmunomodulador. Sin embargo, pese a que en la cohorte analizada se observó una menor incidencia de EICR aguda (grados II-IV y III-IV) en aquellos pacientes que mantenían un QM en Tregs en los días +30 y +60, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. No se observó una asociación de la consecución del QC en Tregs y desarrollo de la EICR en su forma crónica (Tabla 8). Tampoco se observó un impacto en la SG o la SLE de la consecución del QC en Tregs en los diferentes momentos del trasplante. Sin embargo cabe destacar en las curvas de supervivencia que ninguno de los pacientes que mantuvieron un QM en Tregs más

allá del día +60 (n=7) fallecieron por causas relacionadas con el trasplante (MRT), aunque las diferencias obtenidas no fueron estadísticamente significativas (Figura 17). Estos resultados están de acuerdo con publicaciones previas (78,81,82) en las que una mayor cantidad de Tregs post Alo-TPH, ya sea tras expansión *in-vivo* ó *ex-vivo*, se asocia a una mejor reconstitución inmune, y por tanto una menor MRT. En este estudio, la persistencia de Tregs del receptor haría aumentar el número de Tregs post Alo-TPH, y por tanto favorecer su efecto.

Sin embargo, y pese a que en la población global (n=37) no se observaron diferencias en la incidencia de EICR o en las curvas de supervivencia, en función del QM o QC en Tregs, cuando se compararon las curvas SG, SLE y MRT entre el grupo de pacientes con QC en LT y Tregs en la misma determinación (n=26) y el grupo con QC tardío en Tregs (QC LT- QM Tregs, n=9), se observó una mejor SLE en el grupo con QC tardío en Tregs (p=0,037). Este hecho, iría también a favor de que el QM en Tregs se asocie a una mejor reconstitución inmune, y que de alguna manera los Tregs del receptor mantienen su actividad inmunomoduladora evitando complicaciones como la EICR, y probablemente manteniendo el EICL.

Estos resultados pueden tener su influencia, ya que la elección de fármacos y tratamientos tanto en el acondicionamiento como en las etapas previas al Alo-TPH, puede modular la población de Tregs del receptor. Mientras drogas como la 5-Azacitidina o la rapamicina favorecen la expansión de Tregs (85,86) y por tanto un teórico QM en este linaje tras el Alo-TPH, otras como la fludarabina (ampliamente utilizada en regímenes de acondicionamiento) favorecen la consecución de un injerto adecuado y un quimerismo hematopoyético completo (103,104). Así, en función del tipo de enfermedad, o del riesgo de recaída de la misma, se puede (teóricamente) potenciar uno u otro efecto con el uso de diferentes drogas previas al Alo-TPH. Este hecho abre una vía de investigación que hasta la fecha no ha sido reportada.

8.2 Dinámica del quimerismo en leucocitos activados

La cohorte de pacientes incluida en el presente estudio demostró un retraso en la adquisición del QC en LA cuando se comparó con la SP y LT (Figura 14). En el análisis univariante los factores que afectaron a la consecución del QC temprano fueron las patologías linfoides, el número de tratamientos quimioterápicos previos y la ausencia de Fludarabina en el régimen de acondicionamiento. Diferentes publicaciones de diversos autores han demostrado que el número de líneas de quimioterapia, así como el uso de Fludarabina, son factores que afectan a la consecución de un QC temprano (103,104). Por otro lado, cabe destacar que un número importante de pacientes con patología linfóide en nuestra serie habían recibido más de una línea de quimioterapia antes del Alo-TPH (72,4% vs. 27,6%; $p<0.001$), lo cual puede ser un factor confusor en esta asociación previamente descrita (58,103,104). Es importante destacar también, que aunque se utilizaron diferentes regímenes de acondicionamiento (pues se trataba de una cohorte consecutiva no seleccionada), no se encontraron diferencias en la dinámica del quimerismo en LA o LT, atendiendo a si los pacientes habían recibido un acondicionamiento mieloablativo o no (MA vs. NMA), como se ha publicado por otros autores (105), incluyendo autores que han descrito la presencia de células del receptor durante largo tiempo (QM mantenido) tras Alo-TPH NMA (104,106). Este hallazgo, podría estar relacionado con el hecho de que una alta proporción de pacientes de nuestra serie habían recibido más de una línea de quimioterapia en el grupo NMA comparado con el MA (63,6% vs. 32,6%; $p=0,016$).

En cuanto a la cuantificación del quimerismo, también se observó un mayor porcentaje de receptor en LA (mayor proporción con QM) cuando se comparó con la cuantificación de quimerismo en LT y SP, hecho que además resultó estadísticamente significativo en los primeros 60 días post Alo-TPH. Cabe decir que, en el presente estudio, de naturaleza retrospectiva, no se llevó a cabo una cuantificación del total de células CD25+ infundidas, variable que podría condicionar dichos resultados.

8.2.1 Influencia de la dinámica del quimerismo en LA en el desarrollo de complicaciones post Alo-TPH

La EICR está mediada por linfocitos LT del donante, que reconocen antígenos de histocompatibilidad mayores y menores en células diana del receptor (21). Diversos estudios han identificado diferentes factores de riesgo para el desarrollo de la EICR incluyendo el grado de disparidad HLA, la edad del receptor, la disparidad de género entre el donante y el receptor, la fuente de progenitores hematopoyéticos, la intensidad del acondicionamiento, la profilaxis de la EICR, etc. Sin embargo, en el análisis aquí presentado no se ha observado una asociación significativa entre ninguna de estas variables con el desarrollo de la EICR, probablemente debido al número de pacientes incluidos en el análisis (Tabla 9). Un número importante de publicaciones han evaluado el papel de los niveles de quimerismo y su dinámica con el desarrollo de la EICR aguda y crónica. En la mayoría de estos estudios, los pacientes con un mayor número de células infundidas del donante alcanzaron el QC de manera más precoz, mostrando un mayor riesgo para el desarrollo del EICR aguda (58,107). Cuando este análisis se realizó sobre los Linfocitos T CD3+, esta asociación fue todavía mayor (58,98,100,108,109). Sin embargo, existen estudios con resultados contrarios, especialmente cuando el análisis del quimerismo se llevó a cabo en SP no manipulada o seleccionada, o cuando se realizó en MO, incluso cuando el análisis del quimerismo incluyó los linajes leucocitarios, encontrándose pacientes en QM en LT en el momento del desarrollo de EICR tanto aguda (56,99) como crónica (104).

El análisis del quimerismo en LA en la cohorte analizada indicó que pacientes que adquirieron el QC en LA antes del día +30 tenían un mayor riesgo de desarrollar la EICR aguda grado II-IV (Tabla 9, Figura 16). Esta observación fue confirmada en el análisis multivariante, en el que la adquisición del QC en LA antes en el día +30 permaneció como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la EICR aguda. A diferencia de otras publicaciones (35,59–61), la adquisición del QC en LT en el día +30 no estuvo asociada al desarrollo de EICR aguda grado II-IV de manera

significativa, sí observándose una tendencia hacia dicha asociación (Tabla 9, Figura 16). Esta observación, está en concordancia con estudios previos que demuestran la presencia de mayores proporciones de LA en el injerto infundido en pacientes que desarrollan EICRa, y que la depleción de células CD25+ tras el Alo-TPH se asocia a menores tasas de EICR (67).

Nuestros resultados también mostraron una asociación entre la adquisición de QC en LA y el riesgo de desarrollar EICR crónica. El análisis univariante en este contexto identificó dos factores de riesgo para el desarrollo de EICRc, la presencia de EICRa previo y la consecución de QC en LA en el día +90 (Tabla 9).

Durante los últimos años se ha utilizado el seguimiento del quimerismo en LT en la práctica asistencial con la intención de valorar el prendimiento y modular en consecuencia la terapia inmunosupresora post trasplante (43–46). Como ya se ha comentado, el QC temprano en LT, se asocia a un alto riesgo de EICR aguda y crónica. Sin embargo, es relativamente frecuente encontrar pacientes que pese a encontrarse en esta situación de QC temprano en LT, no desarrollan EICR, y pacientes que sí lo hacen encontrándose en QM. En nuestra cohorte de pacientes, el análisis combinado del quimerismo en LA y LT, permitió identificar un grupo de pacientes (17/68) en los que la dinámica del quimerismo en LT y LA fue distinta, así como el momento post Alo-TPH en la que ambos linajes leucocitarios adquirieron el QC. De forma que todos los pacientes que adquirieron el QC en LA antes que en LT (5/5) desarrollaron EICRa grado II-IV (Tabla 10; Figura 18) mientras que sólo 1/11 que alcanzó el QC en LA más tarde que en LT desarrollo EICRa. La importancia del estudio de la dinámica del quimerismo en LA reside en que pacientes en QM en LT, y por lo tanto en teórico bajo riesgo de desarrollar EICR, sí lo desarrollan y además lo hacen inmediatamente tras la consecución de QC en LA. Estas observaciones podrían explicar la inconsistencia de algunos resultados publicados que relacionan o no el desarrollo de EICR a la consecución de QC en LT (56,99).

Se podría sugerir a la luz de estos resultados, que la presencia de linfocitos T anérgicos/naive del receptor no es suficiente para inducir una tolerancia donante-receptor y que por lo tanto no protege para el desarrollo de EICR. Por otro lado, LA del receptor podrían tener efectos supresores en células aloreactivas del donante, y así inducir un estado de tolerancia. Esto justificaría el hecho de que pacientes en QC en LT y QM en LA no desarrollasen EICR.

Los resultados muestran que el QM en LA está asociado a un menor riesgo de desarrollar EICR, y por lo tanto, menor alorreactividad del donante, que, a su vez, podría provocar un incremento en el riesgo de recaída. Sin embargo, esto último no se ha comprobado empíricamente, pues no se ha observado una asociación entre el riesgo de recaída y QM en LA. Este hecho contrasta con diferentes publicaciones en las que la persistencia de celularidad del receptor tras un Alo-TPH está asociado a un riesgo de recaída (46,110), pero sí apoya otras publicaciones que no obtuvieron esta asociación entre QM y recaída (59,111). Más aún, diversos estudios han demostrado que la cantidad de LA en el injerto se asocia con el desarrollo de EICR, pero no con el riesgo de recaída. Así, tanto la depleción CD25+ previo al Alo-TPH, como post Alo-TPH, disminuye la incidencia de EICRa sin provocar un aumento de la tasa de recaída. Estas afirmaciones, por tanto, permiten mitigar la EICR pero sin disminuir el efecto injerto contra leucemia (67,72,75,111,112).

8.3 Pacientes con distinta dinámica de quimerismo en LT, Tregs y LA

Una vez analizada la cohorte completa con los resultados previamente descritos, se realizó una comparación de la incidencia de EICR, SG y SLE entre aquellos subgrupos de pacientes que presentaban dinámicas de consecución de QC iguales o diferentes en Tregs, LT o LA.

Cuando se comparó el quimerismo en Tregs con el de los LT, se observó que 11 pacientes (29%) adquirieron el QC en determinaciones distintas en ambos linajes,

de los que 9 adquirieron el QC en Tregs tardíamente con respecto a los LT. (Tabla 11). Comparado estos 9 pacientes con aquellos que adquirieron el QC en la misma determinación (n=26, 71%), se observó una menor incidencia de EICR grado II-IV (33.3% vs 53.8%), además de una menor incidencia de recaída (11.1% vs 46.1%) lo cual se tradujo en una mejor SLE para el grupo de pacientes con QC tardío en Tregs (p=0.037), sin observarse diferencias en la SG (Figura 19). Por el contrario, de los pacientes con QC en Tregs temprano (2/11), desarrollaron ambos EICR grado 3, falleciendo ambos uno por recaída y otro por complicaciones virales (Tabla 11).

En la comparación del quimerismo en Tregs y LA, se observó que un 27% de los pacientes (10/37) adquirieron el QC en determinaciones diferentes, de los que destacamos que 8/10 mantuvieron un QM en Tregs mientras estaban en QC en LA. Cuando se compararon estos 8 pacientes con los 27 pacientes con QC en LA y Tregs en la misma determinación (73%), se observó una menor incidencia de EICR grado 3-4 en el primer grupo (0% vs 14.8%), además de una menor tasa de recaída (0% vs 40.7%), lo que se tradujo en una mayor SLE a favor del grupo con QC tardío en Tregs (p=0.019) (Figura 20).

Siempre teniendo en cuenta que se trata de un número pequeño de pacientes, y por tanto que no se pueden extraer conclusiones mas sólidas, la persistencia de Tregs “activos” del receptor post Alo-TPH podría beneficiar el desarrollo inmunológico del mismo, pues éstos podrían contribuir a mitigar la incidencia de EICR manteniendo la actividad anti-tumor, e incluso potenciándola hasta que los Tregs del donante alcancen grados de actividad adecuada. Hasta la fecha no hay reportadas publicaciones sobre el quimerismo en Tregs, por lo que dichos hallazgos deberán ser contrastados con estudios prospectivos.

9. Conclusiones

1. Los leucocitos activados (CD25+) y Tregs (CD4+/CD25+) siguen una dinámica distinta a la de los linfocitos T (CD3+) en el 25-30% de los pacientes.
2. La dinámica del quimerismo en Tregs demostró: 1) la consecución del QC es más tardía cuando se comparó con SP, LT y LA; 2) en los pacientes con QM el porcentaje de células de receptor en Tregs es mayor que en SP, LT y LA. 3) los pacientes con patologías de estirpe linfóide y los que no recibieron Fludarabina como parte del acondicionamiento tuvieron mayor probabilidad de alcanzar el QC en Tregs en el día+30.
3. La persistencia de QM en Tregs se asocia, si bien sin significación estadística, con menor MRT. La dinámica de quimerismo en Tregs no afectó a la supervivencia global (SG), supervivencia libre de evento (SLE).
4. La dinámica del quimerismo en LA demostró: 1) la consecución del QC es más tardía cuando se comparó con SP; 2) en los pacientes en QM el porcentaje de células de receptor en LA es mayor que en SP; 3) Los pacientes con patologías de estirpe linfóide, con más de 2 líneas de tratamiento previas y los que no recibieron Fludarabina como parte del acondicionamiento tuvieron mayor probabilidad de alcanzar el QC LA en los días +30 y +60.
5. La consecución del QC en LA anticipa mejor el desarrollo de EICR grado II-IV que el quimerismo en LT, mientras que la consecución de QC en Tregs no mostró asociación con el desarrollo de dicha complicación.
6. La dinámica del quimerismo en LA no afectó a la supervivencia global (SG), supervivencia libre de evento (SLE) ni la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT).

10. Bibliografía

1. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 27 de abril de 2006;354(17):1813-26.
2. Ballen KK, King RJ, Chitphakdithai P, Bolan CD, Agura E, Hartzman RJ, et al. The national marrow donor program 20 years of unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* septiembre de 2008;14(9 Suppl):2-7.
3. Gragert L, Eapen M, Williams E, Freeman J, Spellman S, Baitty R, et al. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *N Engl J Med.* 24 de julio de 2014;371(4):339-48.
4. Raj K, Pagliuca A, Bradstock K, Noriega V, Potter V, Streetly M, et al. Peripheral blood hematopoietic stem cells for transplantation of hematological diseases from related, haploidentical donors after reduced-intensity conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* junio de 2014;20(6):890-5.
5. Mannick JA, Lochte HL Jr, Ashley CA, Thomas Ed, Ferrebee JW. Autografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood.* febrero de 1960;15:255-66.
6. Thomas Ed, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 12 de septiembre de 1957;257(11):491-6.
7. Santos GW, Owens AH Jr. Allogeneic marrow transplants in cyclophosphamide treated mice. *Transplant Proc.* marzo de 1969;1(1):44-6.
8. Storb R, Graham TC, Shiurba R, Thomas ED. Treatment of canine graft-versus-host disease with methotrexate and cyclo-phosphamide following bone marrow transplantation from histoincompatible donors. *Transplantation.* agosto de 1970;10(2):165-72.
9. Thomas Ed, Lochte HL Jr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* octubre de 1959;38:1709-16.
10. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* octubre de 1958;20(1-4):156-66.
11. Rapaport FT, Dausset J, Hamburger J, Hume DM, Dano K, Williams GM, et al. Serologic factors in human transplantation. *Ann Surg.* octubre de 1967;166(4):596-608.
12. Rapaport FT, Dausset J, Casson PR, Converse JM. Hematologic determinants of human histocompatibility. *Surg Clin North Am.* abril de 1967;47(2):543-9.
13. Dausset J, Dupuy JM. [Coincidences or fundamental relationships between leukemogenesis and transplantation antigens]. *Nouv Rev Fr Hématologie.* abril de 1967;7(2):161-6.
14. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood.* abril de 1977;49(4):511-33.
15. Arai S, Jagasia M, Storer B, Chai X, Pidala J, Cutler C, et al. Global and organ-specific chronic graft-versus-host disease severity according to the 2005 NIH Consensus Criteria. *Blood.* 13 de octubre de 2011;118(15):4242-9.
16. Kanda J. Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol.* septiembre de 2013;98(3):300-8.
17. Flowers MED, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem H-P, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood.* 17 de marzo de 2011;117(11):3214-9.

18. Potter VT, Krishnamurthy P, Barber LD, Lim Z, Kenyon M, Ireland RM, et al. Long-Term Outcomes of Alemtuzumab-Based Reduced-Intensity Conditioned Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndrome and Acute Myelogenous Leukemia Secondary to Myelodysplastic Syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 8 de noviembre de 2013;
19. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2 de mayo de 2009;373(9674):1550-61.
20. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:139-70.
21. Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, et al. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1 de febrero de 1996;334(5):281-5.
22. Sung AD, Chao NJ. Acute graft-versus-host disease: Are we close to bringing the bench to the bedside? *Best Pract Res Clin Haematol*. septiembre de 2013;26(3):285-92.
23. Zeiser R, Penack O, Holler E, Idzko M. Danger signals activating innate immunity in graft-versus-host disease. *J Mol Med Berl Ger*. septiembre de 2011;89(9):833-45.
24. Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D, et al. Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med*. septiembre de 2004;10(9):987-92.
25. Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*. 15 de diciembre de 2007;110(13):4576-83.
26. Chen BJ, Deoliveira D, Cui X, Le NT, Son J, Whitesides JF, et al. Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse. *Blood*. 1 de abril de 2007;109(7):3115-23.
27. Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*. 1 de junio de 2005;105(11):4191-9.
28. Baird K, Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol*. noviembre de 2006;13(6):426-35.
29. Socié G, Ritz J. Current issues in chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 17 de julio de 2014;124(3):374-84.
30. Storb R, Gyurkocza B, Storer BE, Sorrow ML, Blume K, Niederwieser D, et al. Graft-Versus-Host Disease and Graft-Versus-Tumor Effects After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol*. 11 de marzo de 2013;31(12):1530-8.
31. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M, Devries MJ, et al. Successful allogeneic bone marrow transplantation in man: chimerism, induced specific tolerance and possible anti-leukemic effects. *Blood*. febrero de 1965;25:179-96.
32. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med*. 18 de junio de 1981;304(25):1529-33.
33. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1 de febrero de 1990;75(3):555-62.

34. Baron F, Maris MB, Sandmaier BM, Storer BE, Sorror M, Diaconescu R, et al. Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de marzo de 2005;23(9):1993-2003.
35. Baron F, Labopin M, Niederwieser D, Vigouroux S, Cornelissen JJ, Malm C, et al. Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia*. diciembre de 2012;26(12):2462-8.
36. Roddie C, Peggs KS. Donor lymphocyte infusion following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther*. abril de 2011;11(4):473-87.
37. Krishnamurthy P, Potter VT, Barber LD, Kulasekararaj AG, Lim ZY, Pearce RM, et al. Outcome of donor lymphocyte infusion after T cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. abril de 2013;19(4):562-8.
38. Kwon M, Serrano D, Gayoso J, Anguita J, Buño I, Díez-Martín JL. [Donor lymphocyte infusions after allogeneic stem cell transplantation: single center clinical experience]. *Med Clínica*. 9 de octubre de 2010;135(11):498-502.
39. Alpdogan O, van den Brink MRM. Immune tolerance and transplantation. *Semin Oncol*. diciembre de 2012;39(6):629-42.
40. Anderson D, Billingham RE, Lampkin GH, Medawar PB. The use of skin grafting to distinguish between monozygotic and dizygotic twins in cattle. *Heredity*. diciembre de 1951;5(3):379-97.
41. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. 10 de marzo de 1956;177(4506):452-4.
42. Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2001;7(9):473-85.
43. McCann SR, Lawler M. Mixed chimaerism; detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transplant*. febrero de 1993;11(2):91-4.
44. Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W, Dueckers G, Handgretinger R, Lang P, et al. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de mayo de 2004;22(9):1696-705.
45. Bader P, Niemeyer C, Willasch A, Kreyenberg H, Strahm B, Kremens B, et al. Children with myelodysplastic syndrome (MDS) and increasing mixed chimaerism after allogeneic stem cell transplantation have a poor outcome which can be improved by pre-emptive immunotherapy. *Br J Haematol*. marzo de 2005;128(5):649-58.
46. Lassaletta A, Ramírez M, Montero JM, González-Vicent M, Balas A, Madero L, et al. Full donor chimerism by day 30 after allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation is associated with a low risk of relapse in pediatric patients with hematological malignancies. *Leukemia*. abril de 2005;19(4):504-6.
47. Díez-Martín JL, Llamas P, Gosálvez J, López-Fernández C, Polo N, de la Fuente MS, et al. Conventional cytogenetics and FISH evaluation of chimerism after sex-mismatched bone marrow transplantation (BMT) and donor leukocyte infusion (DLI). *Haematologica*. mayo de 1998;83(5):408-15.

48. Schaap N, Schattenberg A, Bär B, Mensink E, de Man A, Geurts van Kessel A, et al. Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leucocyte infusion. *Br J Haematol.* enero de 2000;108(1):116-25.
49. Hendriks EC, de Man AJ, van Berkel YC, Stienstra S, de Witte T. Flow cytometric method for the routine follow-up of red cell populations after bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* abril de 1997;97(1):141-5.
50. Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, Law ME, Zinsmeister AR, Stalboerger PG, et al. Fluorescence in situ hybridization with X and Y chromosome probes for cytogenetic studies on bone marrow cells after opposite sex transplantation. *Bone Marrow Transplant.* agosto de 1993;12(2):149-54.
51. Thiede C, Bornhäuser M, Ehninger G. Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Haematol.* 2004;112(1-2):16-23.
52. Kreyenberg H, Hölle W, Möhrle S, Niethammer D, Bader P. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Tuebingen experience. *Leukemia.* enero de 2003;17(1):237-40.
53. Buño I, Nava P, Simón A, González-Rivera M, Jiménez JL, Balsalobre P, et al. A comparison of fluorescent in situ hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation. *Haematologica.* octubre de 2005;90(10):1373-9.
54. Scharf SJ, Smith AG, Hansen JA, McFarland C, Erlich HA. Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers. *Blood.* 1 de abril de 1995;85(7):1954-63.
55. Khan F, Agarwal A, Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant.* julio de 2004;34(1):1-12.
56. Mattsson J, Uzunel M, Brune M, Hentschke P, Barkholt L, Stierner U, et al. Mixed chimaerism is common at the time of acute graft-versus-host disease and disease response in patients receiving non-myeloablative conditioning and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* diciembre de 2001;115(4):935-44.
57. Breuer S, Preuner S, Fritsch G, Daxberger H, Koenig M, Poetschger U, et al. Early recipient chimerism testing in the T- and NK-cell lineages for risk assessment of graft rejection in pediatric patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* marzo de 2012;26(3):509-19.
58. El-Cheikh J, Vazquez A, Crocchiolo R, Furst S, Calmels B, Castagna L, et al. Acute GVHD is a strong predictor of full donor CD3+ T cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Am J Hematol.* diciembre de 2012;87(12):1074-8.
59. Balon J, Hałaburda K, Bieniaszewska M, Reichert M, Bieniaszewski L, Piekarska A, et al. Early complete donor hematopoietic chimerism in peripheral blood indicates the risk of extensive graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* junio de 2005;35(11):1083-8.
60. Miura Y, Tanaka J, Toubai T, Tsutsumi Y, Kato N, Hirate D, et al. Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after allogeneic myeloablative and non-myeloablative stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* mayo de 2006;37(9):837-43.
61. Mohty M, Avinens O, Faucher C, Viens P, Blaise D, Eliaou J-F. Predictive factors and impact of full donor T-cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica.* julio de 2007;92(7):1004-6.

62. Baron F, Baker JE, Storb R, Gooley TA, Sandmaier BM, Maris MB, et al. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood*. 15 de octubre de 2004;104(8):2254-62.
63. Ketterl TG, Flesher M, Shanley R, Miller W. Early CD3+/CD15+ peripheral blood leukocyte chimerism patterns correlate with long-term engraftment in non-malignant hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. abril de 2014;49(4):572-5.
64. Lange T, Hubmann M, Burkhardt R, Franke G-N, Cross M, Scholz M, et al. Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia*. marzo de 2011;25(3):498-505.
65. Bornhäuser M, Oelschlaegel U, Platzbecker U, Bug G, Lutterbeck K, Kiehl MG, et al. Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. noviembre de 2009;94(11):1613-7.
66. Fehse B, Frerik O, Goldmann M, Bulduk M, Zander AR. Efficient depletion of alloreactive donor T lymphocytes based on expression of two activation-induced antigens (CD25 and CD69). *Br J Haematol*. junio de 2000;109(3):644-51.
67. Stanzani M, Martins SLR, Saliba RM, St John LS, Bryan S, Couriel D, et al. CD25 expression on donor CD4+ or CD8+ T cells is associated with an increased risk for graft-versus-host disease after HLA-identical stem cell transplantation in humans. *Blood*. 1 de febrero de 2004;103(3):1140-6.
68. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:453-79.
69. Liang D, Zuo A, Shao H, Born WK, O'Brien RL, Kaplan HJ, et al. Role of CD25+ dendritic cells in the generation of Th17 autoreactive T cells in autoimmune experimental uveitis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de junio de 2012;188(11):5785-91.
70. Alkhamis T, Barbic J, Crnogorac-Jurcevic T, Greenlaw RE, Peakman M, Jurcevic S. Antibody combination therapy targeting CD25, CD70 and CD8 reduces islet inflammation and improves glycaemia in diabetic mice. *Clin Exp Immunol*. noviembre de 2012;170(2):139-48.
71. Paz Morante M, Briones J, Canto E, Sabzevari H, Martino R, Sierra J, et al. Activation-associated phenotype of CD3 T cells in acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*. julio de 2006;145(1):36-43.
72. Ho VT, Zahrieh D, Hochberg E, Micale E, Levin J, Reynolds C, et al. Safety and efficacy of denileukin difitox in patients with steroid-refractory acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 15 de agosto de 2004;104(4):1224-6.
73. Chen H, He X, Yang K, Lou J, Liu X, Guo Z, et al. [Treatment of severe intestinal acute graft-versus-host disease with CD25 monoclonal antibody in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 19 de octubre de 2010;90(38):2693-6.
74. Mavroudis DA, Dermime S, Molldrem J, Jiang YZ, Raptis A, van Rhee F, et al. Specific depletion of alloreactive T cells in HLA-identical siblings: a method for separating graft-versus-host and graft-versus-leukaemia reactions. *Br J Haematol*. junio de 1998;101(3):565-70.
75. Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Yvon E, Huls H, Sili U, Wieder ED, et al. Selective depletion of donor alloreactive T cells without loss of antiviral or antileukemic responses. *Blood*. 15 de septiembre de 2003;102(6):2292-9.
76. Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, et al. Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 de febrero de 2006;103(8):2758-63.

77. Walker MR, Kaspirowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*. noviembre de 2003;112(9):1437-43.
78. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 14 de febrero de 2003;299(5609):1057-61.
79. Wing K, Larsson P, Sandström K, Lundin SB, Suri-Payer E, Rudin A. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells from human thymus and cord blood suppress antigen-specific T cell responses. *Immunology*. agosto de 2005;115(4):516-25.
80. Barzaghi F, Passerini L, Bacchetta R. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity. *Front Immunol*. 2012;3:211.
81. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 30 de mayo de 2008;133(5):775-87.
82. Hess AD. Modulation of graft-versus-host disease: role of regulatory T lymphocytes. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. enero de 2006;12(1 Suppl 2):13-21.
83. Sorokin R, Kimura H, Schroder K, Wilson DH, Wilson DB. Cyclosporine-induced autoimmunity. Conditions for expressing disease, requirement for intact thymus, and potency estimates of autoimmune lymphocytes in drug-treated rats. *J Exp Med*. 1 de noviembre de 1986;164(5):1615-25.
84. Veerapathran A, Pidala J, Beato F, Betts B, Kim J, Turner JG, et al. Human regulatory T cells against minor histocompatibility antigens: ex vivo expansion for prevention of graft-versus-host disease. *Blood*. 26 de septiembre de 2013;122(13):2251-61.
85. Goodyear OC, Dennis M, Jilani NY, Loke J, Siddique S, Ryan G, et al. Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 5 de abril de 2012;119(14):3361-9.
86. Zeiser R, Leveson-Gower DB, Zambricki EA, Kambham N, Beilhack A, Loh J, et al. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood*. 1 de enero de 2008;111(1):453-62.
87. Bayer AL, Jones M, Chirinos J, de Armas L, Schreiber TH, Malek TR, et al. Host CD4+CD25+ T cells can expand and comprise a major component of the Treg compartment after experimental HCT. *Blood*. 15 de enero de 2009;113(3):733-43.
88. Locatelli F, Lucarelli B, Merli P. Current and future approaches to treat graft failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Pharmacother*. enero de 2014;15(1):23-36.
89. Díez-Martín JL, Gómez-Pineda A, Serrano D, Carrión R, Balsalobre P, Buño I. Successful treatment of incipient graft rejection with donor leukocyte infusions, further proof of a graft versus host lymphohaemopoietic effect. *Bone Marrow Transplant*. mayo de 2004;33(10):1037-41.
90. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, Lowenberg B, Wijermans PW, Nimer SD, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*. 15 de julio de 2006;108(2):419-25.
91. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. diciembre de 2005;11(12):945-56.

92. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant.* junio de 1995;15(6):825-8.
93. Buño I, Nava P, Simón A, González-Rivera M, Jiménez JL, Balsalobre P, et al. A comparison of fluorescent in situ hybridization and multiplex short tandem repeat polymerase chain reaction for quantifying chimerism after stem cell transplantation. *Haematologica.* octubre de 2005;90(10):1373-9.
94. Przepiorka D, Smith TL, Folloder J, Khouri I, Ueno NT, Mehra R, et al. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood.* 15 de agosto de 1999;94(4):1465-70.
95. Przepiorka D, Anderlini P, Saliba R, Cleary K, Mehra R, Khouri I, et al. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood.* 15 de septiembre de 2001;98(6):1695-700.
96. Sung AD, Chao NJ. Concise review: acute graft-versus-host disease: immunobiology, prevention, and treatment. *Stem Cells Transl Med.* enero de 2013;2(1):25-32.
97. Perez-Simon JA, Diez-Campelo M, Martino R, Sureda A, Caballero D, Canizo C, et al. Impact of CD34+ cell dose on the outcome of patients undergoing reduced-intensity-conditioning allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Blood.* 1 de agosto de 2003;102(3):1108-13.
98. Rupa-Matysek J, Lewandowski K, Nowak W, Sawiński K, Gil L, Komarnicki M. Correlation between the kinetics of CD3+ chimerism and the incidence of graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc.* junio de 2011;43(5):1915-23.
99. Baron F, Little M-T, Storb R. Kinetics of engraftment following allogeneic hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity or nonmyeloablative conditioning. *Blood Rev.* mayo de 2005;19(3):153-64.
100. Pérez-Simón JA, Caballero D, Diez-Campelo M, Lopez-Pérez R, Mateos G, Cañizo C, et al. Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation. *Leukemia.* agosto de 2002;16(8):1423-31.
101. Nguyen VH, Shashidhar S, Chang DS, Ho L, Kambham N, Bachmann M, et al. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 15 de enero de 2008;111(2):945-53.
102. Shaffer J, Villard J, Means TK, Alexander S, Dombkowski D, Dey BR, et al. Regulatory T-cell recovery in recipients of haploidentical nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation with a humanized anti-CD2 mAb, MEDI-507, with or without fludarabine. *Exp Hematol.* julio de 2007;35(7):1140-52.
103. Valcárcel D, Martino R, Caballero D, Mateos MV, Pérez-Simón JA, Canals C, et al. Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* marzo de 2003;31(5):387-92.
104. Blau IW, Schmidt-Hieber M, Leschinger N, Göldner H, Knauf W, Hopfenmüller W, et al. Engraftment kinetics and hematopoietic chimerism after reduced-intensity conditioning with fludarabine and treosulfan before allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol.* agosto de 2007;86(8):583-9.
105. Mickelson DM, Sproat L, Dean R, Sobecks R, Rybicki L, Kalaycio M, et al. Comparison of donor chimerism following myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* enero de 2011;46(1):84-9.

106. Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N, Leitman S, et al. Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood*. 1 de noviembre de 1999;94(9):3234-41.
107. Lawler M, McCann SR, Marsh JCW, Ljungman P, Hows J, Vandenberghe E, et al. Serial chimerism analyses indicate that mixed haemopoietic chimerism influences the probability of graft rejection and disease recurrence following allogeneic stem cell transplantation (SCT) for severe aplastic anaemia (SAA): indication for routine assessment of chimerism post SCT for SAA. *Br J Haematol*. marzo de 2009;144(6):933-45.
108. Van Besien K, Dew A, Lin S, Joseph L, Godley LA, Larson RA, et al. Patterns and kinetics of T-cell chimerism after allo transplant with alemtuzumab-based conditioning: mixed chimerism protects from GVHD, but does not portend disease recurrence. *Leuk Lymphoma*. noviembre de 2009;50(11):1809-17.
109. Nikolousis E, Robinson S, Nagra S, Brookes C, Kinsella F, Tauro S, et al. Post-transplant T cell chimerism predicts graft versus host disease but not disease relapse in patients undergoing an alemtuzumab based reduced intensity conditioned allogeneic transplant. *Leuk Res*. 5 de febrero de 2013;
110. Lamba R, Abella E, Kukuruga D, Klein J, Savasan S, Abidi MH, et al. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogeneic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. *Leukemia*. octubre de 2004;18(10):1681-6.
111. Mossallam GI, Kamel AM, Storer B, Martin PJ. Prognostic utility of routine chimerism testing at 2 to 6 months after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. marzo de 2009;15(3):352-9.
112. Mavroudis DA, Dermime S, Molldrem J, Jiang YZ, Raptis A, van Rhee F, et al. Specific depletion of alloreactive T cells in HLA-identical siblings: a method for separating graft-versus-host and graft-versus-leukaemia reactions. *Br J Haematol*. junio de 1998;101(3):565-70.

11. Anexo I

Achievement of early complete donor chimerism in CD25⁺-activated leukocytes is a strong predictor of the development of graft-versus-host-disease after stem cell transplantation

Carolina Martínez-Laperche^{a,b}, Víctor Noriega^{a,b}, Mi Kwon^{a,b}, Pascual Balsalobre^{a,b},
Milagros González-Rivera^{b,c}, David Serrano^{a,b}, Javier Anguita^{a,b}, Jorge Gayoso^{a,b},
José Luis Díez-Martín^{a,b}, and Ismael Buño^{a,b}

^aDepartment of Hematology and Hemotherapy, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ^bInstituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ^cSequencing and Genotyping Research Support Service, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

(Received 31 July 2014; revised 5 September 2014; accepted 6 September 2014)

Chimerism dynamics in bone marrow, peripheral blood (PB), and T lymphocytes (TL) has been associated with the development of various complications after allogeneic stem-cell transplantation (allo-SCT). In the present study, the usefulness of chimerism monitoring in CD25⁺-activated leukocytes (AL), together with that in bone marrow, PB, and TL, for the anticipation of complications after allo-SCT, has been analyzed in 68 patients. In AL, we observed a slower dynamics toward complete chimerism (CC) than in PB ($p = 0.042$), while no significant differences were found between TL and PB ($p = 0.12$). Complete chimerism achievement in AL at day +30 has shown to be an independent risk factor for the development of grade II–IV acute graft-versus-host disease (aGvHD; hazard ratio [95% confidence interval]: 11.9 [1.5–91.7]; $p = 0.017$). Moreover, among patients achieving CC in TL and AL at different time-points after SCT ($n = 17/68$), the incidence of grade II–IV aGvHD was significantly higher in patients who achieved CC earlier in AL (5/5) than in those who achieved CC earlier in TL (1/11; $p = 0.001$). Therefore, achievement of early complete donor chimerism in CD25⁺ AL is a strong predictor for the development of aGvHD. Prospective analysis of chimerism in AL could improve the post-SCT management of immunosuppressive therapy in transplanted patients. Copyright © 2015 ISEH - International Society for Experimental Hematology. Published by Elsevier Inc.

Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (allo-SCT) is the only curative option for the management of many patients with neoplastic malignancies [1]. After the infusion of the donor graft, there may be a coexistence of donor and recipient hematopoiesis in the patient, called ‘mixed chimerism’ (MC), until the new hematopoietic system in the recipient is fully donor-derived, a state known as ‘complete chimerism’ (CC) [2]. Donor/recipient chimerism after allo-SCT is known to be a dynamic process with

profound implications for the outcome of allo-SCT [3–5]. Quantitative chimerism monitoring, especially when different leukocyte lineages are tested, is therefore a useful tool for the management of transplanted patients, since it allows the anticipation of various complications that may affect the success of the procedure [6–9].

Several studies have shown that chimerism analysis in CD3⁺ T lymphocytes (TL) is more informative than the analysis of peripheral blood (PB) for the evaluation of events related to the alloreactivity established between donor and recipient after allo-SCT, such as graft-versus-host disease (GvHD) or graft-versus-leukemia (GvL) [10–13]. Although TL chimerism is currently the cornerstone of leukocyte lineage chimerism analysis, the fact that the TL subset may include both alloreactive and naive cells could hamper the clinical utility of chimerism studies. Therefore, further dissection of the TL subset targeting activated leukocytes (AL) for chimerism analysis could improve the clinical

CM-L and VN contributed equally to this work.

Offprint requests to: Dr. Ismael Buño, Haematology Department, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hosp. G.U. Gregorio Marañón, Oncology Building (floor -1), C/ Doctor Esquerdo 46, Madrid 28007, Spain; E-mail: ismaelbuno@gmail.com; Ismael.buno@salud.madrid.org

Supplementary data related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2014.09.003>.